MTA Doktori Értekezés

Az ösztrogén nem-klasszikus hatásainak mechanizmusa és szerepe a központi idegrendszerben

Dr. Ábrahám István

Centre for Neuroendocrinology, Department of Physiology, University of Otago, New Zealand



2012

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	
2. Köszönetnyilvánítás	7
3. Bevezetés és irodalmi háttér	8
3.1. A 17β-ösztradiol	8
3.2. Ösztrogén receptorok	9
3.3. Klasszikus genomiális hatások	12
3.4. Az E2 nem-klasszikus intracelluláris és membrán hatásai	13
3.5. Az ösztrogén központi idegrendszeri hatásai: a nemi dimorfizmustól	15
a neuroprotekcioig	17
2.7. Az E2 és a GARA neuronok	1/
3.7. Az E2 es a basalis eloagyi kolinerg neuronok	21
4. Célkitűzés	24
4.1. Célkitűzések részletezése	24
5. Metodika	25
5.1. Állatok	25
5.1.1. A pubertás és az ösztrusz ciklus vizsgálata	26
5.1.2. A termékenység vizsgálata	27
5.2. Műtéti kezelések	27
5.2.1. Gonadektómia	27
5.2.2. Sztereotaxikus mikroiniekciók	27
5.2.3. Ösztrogén kezelés	28
5.2.4. Ösztrogén negatív visszacsatolás protokoll	28
5.2.5.Szövettani perfúzió	28
5.3. Immunhisztokémia	28
5.4. Hisztokémia	29
5.5. Szövettani képanalízis	30
5.5.1. ERK1/2 és CREB expresszió meghatározása központi idegrendszerben	30
5.5.2. ERK1/2 és CREB expresszió kvantifikálása a GnRH neuronban	30
5.5.3. GnRH neuron somaticus tüske analízis	31
5.5.4. CREB-ChAT kettős ielölés analízise	32
5.5.5. ChAT immunpozitív neuronok meghatározása az SI/NBM-ben és az AChE	32
tartalmú rostok analízise az agykéregben NMDA adását követően	
5.6. E2 és LH radio-immuno-assav (RIA)	32
5.7. Western blot analízis	33
5.8. In vitro egy-seit elektrofiziológia	33
5.9. Túlélő agyszelet készítése a CREB és az ERK1/2 foszforiláció in vitro	34
vizsgálataihoz	
5.10. Ca ²⁺ imaging és adat analízis	35
5.11. Egy-molekula detekciós mikroszkópia	36
5.12. Statisztika	36

6. Eredmények és következtetések	
6.1. Az ösztrogének gyors hatása a CREB és az ERK1/2 foszforilációra a központi idegrendszerben in vivo	38
6.1.1. Eredmények	38
6111 Az E2 hatása a CREB és az ERK1/2 foszforilációiára a központi	38
idegrendszerben	20
6.1.1.2. A klasszikus ösztrogén receptorok szerepe az E2 gyors	39
nem-klasszikus hatásaiban a központi idegrendszerben	42
6.1.1.3. Nemi különbségek az E2 nem-klasszikus hatásaiban	42
6.1.1.4. A genistein nem-klasszikus hatásai	43
612 Következtetések	44
6.1.2.1. A klasszikus ösztrogén receptorok alapvető szerepe az E2 gyors hatásaiban	44
6.1.2.2. Nemi különbségek az E2-indukálta CREB és	46
ERK1/2 foszforilációra az agy különböző területein	47
6.1.2.3. A genistein nem-klasszikus hatásai a neonatális agy hypothalamusában	.,
6.2 Az F2 nem-klasszikus hatásai a CnRH neuronokon	48
6.2.1 Fradmányak	18
<u>6.2.1.1. Az E2 avors hatása a CnPH nauron Ca²⁺ dinamikáiára</u>	40
6.2.1.2. Az E2 batána az IDSC ne a CuDH neuron ban	+0 50
0.2.1.2. Az E2 halasa az IPSC-re a GRKH heurondan	52
0.2.1.5. Az E2 natasa a CREB foszfortlactora a GnRH neuronban	55
6.2.1.4. Az osztrogen indukalta CREB foszforilacio jelatviteli utvonalai a GnRH neuronban	54
6.2.1.5. Az indirekt transzszinaptikus és a közvetlen folyamatok szerepe	57
az E2 indukálta ERK1/2 foszforilációban a GnRH neuronokon	
6.2.1.6. A fiziológiás E2 koncentráció szerepe a nem-klasszikus folyamatokban a GnRH neuronokban	58
6.2.2. Következtetések	59
$\overline{6.2.2.1}$. Az E2 nem-klasszikus hatása emeli a Ca ²⁺ tranzienseket a GnRH neuronokban	60
6.2.2.2. Az E2 a PKA/CaMKII-ERK1/2 szignáltranszdukciós rendszeren keresztül aktiválja a CREB-et a GnRH neuronokban	60
6 2 2 3 Az E2 nem-klasszikus hatásának támadáspontiai a GnRH neuronhan:	61
<i>ERK1/2. mint koincidencia detektor</i>	01
6 2 2 4 Az E2 indukálta CREB foszforiláció fiziológiásan releváns jelenség	62
0.2.2.4. M2 D2 mankana CADD joszjórnació jiziólógiasan relevans jelenseg	02
6.3. A CREB szerepe az ösztrogén indukálta negatív visszacsatolásban a GnRH neuronokon	64
631 Fredmények	64
6.3.1.1. A CREB GnRH neuron specifikus deléciója és a GnRH neuronok száma	64
a GnRH-CREB és a CREM KO egerekben	
6.3.1.2. A pubertás és az ösztrusz ciklus a CREB mutáns egerekben	64
6.3.1.3. CREB mutáns állatok termékenysége	67
6.3.1.4. Negatív ösztrogén visszacsatolás CREB mutáns egerekben	68
6.3.1.5. A GnRH neuronok morfológiája CREB KO egerekben	69
<u>6.3.2. Következtetések</u>	70
6.3.2.1. GnRH neuronok száma a CREB mutáns egerekben	70
6.3.2.2 A pubertás, az ösztrusz ciklus és a termékenység a CREB mutáns egerekben	70
6.3.2.3. Negatív ösztrogén visszacsatolás CREB mutáns egerekben	71
6.3.2.4. A GnRH neuronok morfológiája CREB KO egerekben	71
3	

6.4. Nem-klasszikus ösztrogén hatások a basalis előagyi kolinerg neuronokban	72
<u>6.4.1.Eredmények</u>	72
6.4.1.1. Egy-molekula detekciós mérések a BEK neuronok TrkA receptorain	72
6.4.1.2. Az E2 hatása a CREB foszforilációra a BEK neuronokon	73
6.4.1.3. Az ösztrogén receptorok szerepe az E2 indukálta CREB	74
foszforilációra a BEK neuronokban	
6.4.1.4. Az E2-indukálta CREB foszforiláció TTX érzékenységének vizsgálata in vitro	75
6.4.1.5. Az E2 indukálta CREB foszforilációban részt vevő jelátvivő útvonalak	76
6.4.1.6. Az intakt versus ovariektomizált állatok E2 indukálta CREB	77
foszforilációjának összehasonlítása	
<u>6.4.2. Következtetések</u>	77
6.4.2.1. Egy-molekula detekciós mérések élő BEK neuronok neutrofin receptorain	78
6.4.2.2. Az E2 közvetlenül foszforilálja a CREB-et a BEK neuronokban	78
6.4.2.3. A CREB foszforiláció dinamikája	78
6.4.2.3. A CREB foszforiláció anatómiai specificitása, a jelátvivő pályák	79
szerepe a BEK neuronokban	
6.4.2.4. Az E2 indukálta CREB foszforiláció fiziológiás szerepe a BEK neuronban	79
6.5. A nem-klasszikus ösztrogén hatások szerepe az ösztrogén indukálta	81
neuroprotekcióban a bazális kolinerg neuronokon in vivo	
<u>6.5.1. Eredmények</u>	81
6.5.1.1. Az NMDA hatása a BEK neuronokra	81
6.5.1.2. Az E2 hatása a kéreg kolinerg rostdenzitására	83
és a kolinerg sejttestek számára az SI/NBM-ben	
6.5.1.3. Az ERa szerepe az E2 protektív hatásában a BEK neuronokon	84
6.5.1.4. A nem-klasszikus E2 jelátvivő rendszer aktivációjának hatása	84
az NMDA indukálta kolinerg rostpusztulásra	
6.5.1.5. A PKA és a MAPK jelátviteli pályák szerepe	85
az E2 indukálta neuroprotekcióban a BEK neuronokon	
6.5.1.6. Az endogénen termelődő E2 hatása a neuroprotektív E2 kezelésre a BEK neuronokon	86
6.5.1.7. Az öregedés hatása az E2-indukálta neuroprotektív folyamatokra	86
a BEK neuronokon	
6.5.2. Következtetések	87
6.5.2.1. Az egyszeri E2 kezelés neuroprotektív a BEK neuronokon:	88
az ERa és a nem-klasszikus hatások központi szerepe	
6.5.2.2. Az egyszeri nagy dózisú E2 injekció terápiás relevanciája	90
7. Összefoglalás	91
7.1. A nem-klasszikus ösztrogén hatások a központi idegrendszerben	91
és azok jelátvivő mechanizmusa a kolinerg és a GnRH neuronokban	
7.2. A nem-klasszikus ösztrogén hatások jelentősége	92
8. Irodalom	93
8.1. Az értekezés általános irodalomjegyzéke	94
8.2. Az értekezés alapjául szolgáló, a szövegben sorszámmal citált saját közlemények jegyzéke	110
8.3. A PhD fokozat megszerzése óta megjelent egyéb saját közlemények	112
8.4. Szcientometriai adatok az értekezés benyújtásakor	11

1. Rövidítések jegyzéke

ACSF	arteficiális cerebrospinalis folyadék
AchE	acetilkolinészteráz
AHA	anterior hypothalamicus area
AIP	autocamtide-2-related inhibitory peptide
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANOVA	analysis of variance
AP-1	activator protein-1
AP5	DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid
ATF	activating transcription faktor
AVPV	anteroventral-periventricular nucleus
BDNF	brain derived neurotrophin factor
cAMP	cyclic adenosine 3',5'-monophosphate
CaMKII	calcium-calmodulin kinase II
CBP	CREB-binding protein
ChAT	kolinacetyltranszferáz
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CREB	cAMP response element binding protein
CREM	cyclic AMP responsive modulator protein
DAB	diaminobenzidine tetrahydrochloride
DMSO	dimethyl sulfoxide
E2	17β-ösztradiol
ERα	ösztrogén receptor alfa
ERβ	ösztrogén receptor béta
ERE	ösztrogén response element
ERK1/2	extracellular signal regulated kináz
FSH	folliculus stimuláló hormon
GABA	γ-amino vajsav
gCTX	cingularis cortex
GF109203X	bisindolylmaleimid I hydrochlorid
GnRH	gonadotropin-releasing hormon
GPER1	G-protein kapcsolt ösztrogén receptor 1
GPR 30	G-protein kapcsolt receptor 30
HDB	horizontális diagonális köteg
hsp90	heat shock protein 90
HHG	hypothalamus-hipofízis gonad tengely
Kd	disszociációs konstans
КО	knock out
LH	luteinizáló hormon
LHRH	luteinizáló hormon releasing hormon
МАРК	mitogen-activated protein kináz
MEK1/2	mitogen-activated protein kináz 1/2
mGluR1	metabotróp glutamát receptor 1
mIPSCs	miniatür posztszinaptikus gátló áramok
MPN	medialis preopticus mag
PVNm	paraventrikuláris mag magnocellularis szubdiviziója
MS	medialis septum
N1DAB	nickel-enhanced diaminobenzidine tetrahydrochloride

NMDA	N-methyl-D-aszpartát
OVLT	organum vasculosum of lamina terminalis
OVX	ovariektomizált
PFA	paraformaldehid
PI3K	tyrosine phosphatidylinositol 3-kináz
PKA	protein kináz A
РКС	protein kináz C
RIA	radioimmunoassay
rPOA	rostralis preopticus area
Ras	"rat sarcoma" kis GTPáz protein
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SI/NBM	substantia innominata/nucleus basalis magnocellularis
Sos	Son of sevenless
Src	Sarc kináz
TBS	Tris-phosphate puffer és fizológiás sóoldat
TrkA	tropomyosinhoz kapcsolt kináz A
TTX	tetrodotoxin
U0126	1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-amino-phenylthio]butadien
VDB	ventralis diagonális köteg
vlVMN	ventro-medialis mag ventro-laterális része

2. Köszönetnyilvánítás

Azon szerencsés kutatók közé tartozom, akiknek lehetősége nyílt, hogy jó nevű és világhírű magyarországi kutatóhelyeken (Pécsi Orvostudományi Egyetem Élettani Tanszék, Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Eötvös Loránd Tudományegyetem) és méltán híres külföldi egyetemeken és azok tanszékein/intézeteiben (Babraham Institute, University of Cambridge, UK; Department of Animal Physiology University of Groningen, The Netherlands; Department of Physiology, University of Otago, New Zealand; Kyoto University, Japan) végezhettem, ill. végzem kutató munkámat. Ezekben az intézményekben egy csapatot alkotva kollégáimmal arra szövetkeztünk, hogy feltérképezzük az ösztrogének központi idegrendszeri hatásait. Ezért úgy gondolom, hogy ezek az eredmények nem jöhettek volna létre azok nélkül az emberek nélkül, akik a kutató csoportomban dolgoztak az elmúlt évek során illetve dolgoznak jelenleg is. Így köszönet illeti a következő kutatókat: Dr. Szegő Éva, Dr. Barabás Klaudia, Dr. Kőszegi Zsombor, Dr. Rachel Cheong, Dr. Kwakowsky Andrea, Dr. Csercsik Dávid, Dr. Alexa Veenema, Kaszás Attila, Balogh Júlia, Daniil Potapov, Soo Hyun Kim, Barad Zsuzsanna, Emeline-Tolod Kemp, Marion Turnbull.

Sok köszönettel tartozom továbbá mindazoknak, akik megszerettették velem a kutatómunkát, és akik egyengették valamilyen módon pályafutásomat. Ezért köszönettel tartozom a következő embereknek: Prof. Lénárd László, Prof. Hajnal András, Dr. Jandó Gábor, Prof. Karádi Zoltán, Dr. Makara Gábor, Dr. Kovács Krisztina, Dr. Juhász Gábor, Prof. Paul Luiten. Köszönet illeti a kollaborátoraimat, akikkel kölcsönösen támogattuk és támogatjuk egymást céljaink elérésében: Prof. Allan Herbison, Dr. Seong-Kyu Han, Prof. Akihiro Kusumi, Prof. Paul Luiten, Prof. Harkány Tibor, Prof. Sármay Gabriella, Prof. Matkó János, Dr. Sárvári Miklós.

Külön szeretném megköszönni feleségemnek Dr. Zsolnai Krisztinának, azt hogy oly sok éven át viseli egy kutató életpálya néhol szélsőségesen viszontagságos helyzeteit. Nagyon sok köszönet illeti azért a rengeteg segítségért, amit azért nyújt nekem, hogy a céljaimat elérhessem. Szeretném megköszönni gyermekeimnek is, Balázsnak és Viktóriának, akik annyi örömet okoznak, és akik nélkül biztosan nem tudtam volna elérni ezeket az eredményeket.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni szüleimnek, édesapámnak és édesanyámnak, a testvéremnek törődésüket és fáradhatatlan segítségüket, mert nélkülük nem váltam volna azzá, aki most vagyok. Sajnos édesapám nem élhette meg ennek a műnek a születését, ezért ezt a munkámat az Ő emlékének szeretném ajánlani.

3. Bevezetés és irodalmi háttér

Az ösztrogén hormonok rendkívül hatékony vegyületek, az emlősök szervezetének minden sejtjéhez eljutva befolyásolják szinte valamennyi gén működését. Az 1920-as és 30-as években több kutató, Adolf Butenandt, Tadeus Reichstein és Edward Adelbert Doisy egymástól függetlenül fedeztek fel és karakterizáltak számos hormont, többek között ösztrogén hormonokat. Napjainkban az ösztrogénekkel foglalkozó kutatások száma óriási méreteket ölt. Csak 2011-ben az ösztrogénnel foglalkozó cikkek száma meghaladta az egymilliót. Az elmúlt években a klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy a hormonpótló terápiáknak több súlyos mellékhatása van, ami valósággal sokkolta a gyógyszergyárakat és a tudományos közvéleményt (Rossouw és mtsai., 2002; Shumaker és mtsai., 2003). Ugyancsak egyre több probléma merült fel a környezetben található ösztrogénekkel kapcsolatban, különösen a szója tartalmú élelmiszerek elterjedése miatt. Ezeknek a fejleményeknek köszönhetően egyre több kutatócsoport kezdett el foglalkozni a szervezet különböző sejtjeiben az ösztrogének hatásmechanizmusának kutatásával. Az alább bemutatott kísérleteinkben mi is azt a célt tűztük ki magunk elé, hogy jobban megismerjük az ösztrogének hatásmechanizmusát és fiziológia jelentőségét a központi idegrendszerben.

Azért, hogy a kísérleti célkitűzéseink, az elért eredmények valamint azok értelmezése érthetővé váljanak az olvasó számára, eredményeink ismertetése előtt ebben a fejezetben tisztázom azokat a főbb szakirodalmi adatokat, melyek kutatásunk előzményét képezték. Az alábbiakban bemutatom az ösztrogén központi idegrendszeri hatásait, beleértve az ösztrogének klasszikus és nem-klasszikus hatásmechanizmusát, az ösztrogén receptorok szerepét és azt a két neuronális fenotípust, a gonadotropin-releasing hormont (GnRH) és a kolinerg neuronokat, melyeken az ösztrogének hatásait tanulmányozzuk.

alapszerkezete

molekulák

3.1. A 17 β -ösztradiol

Azösztrogénhormonszénhidrogénvázra, azösztránra(1,3,5-ösztratrién)vezethetővissza.Azemlősökbenháromféleösztrogéntalálható17β-



a

18

C-atomból

álló

lipofil

1.ábra Az ösztrogén hormon molekulák szerkezeti képlete

ösztradiol, ösztron és ösztriol, mely útóbbi hydroxydehydroepiandroszteron szulfátból metabolizálódik a fetus májában illetve a mellékvesekéregben (Katzenellenbogen és mtsai., 2000) (1. ábra). A 17 β-ösztradiol (E2) az ovárium leghatékonyabb ösztrogén hormonja, ösztrogén hatása sokszorosa az ösztronénak illetve az ösztriolénak. Az E2 szintézise az ovárium theca internájában acetil-CoA-ból és koleszterinből indul ki, amiből androsztendion képződik több lépésen keresztül, ami az E2 szintézis "előhormonja". Az androsztendion átlép a basalis membránon és a granulosa sejtekben több lépésben az aromatáz enzim segítségével E2-vé alakul, majd az E2 a véráramba kerül. Mivel az E2 lipofil molekula, szüksége van egy szállító molekulára, hogy a sejtek közötti tér vizes fázisain átjusson, ezért a szex szteroid kötő globulinhoz kötődve jut el a célsejtekhez (Hanukoglu, 1992). Az E2 túlnyomó többsége, 98%-a ebben a kötött formában található meg a szervezetben (Hanukoglu, 1992).

Kísérleteinkben az E2 hatásait vizsgáltuk, ezért a doktori mű további részében a gonadális szteroidok közül az E2-vel foglalkozom.

3.2. Ösztrogén receptorok

Az ösztrogén hormonok rendkívüli hatékonyságát valójában evolucionárisan az egyik legrégebbi receptor családnak az ösztrogén receptoroknak köszönheti. Az ösztrogén receptorok az emlősök valamennyi sejtjében megtalálhatók. Az első ösztrogén receptort 1986-ban Green és munkatársainak sikerült klónozni patkány uterus-ából (Green és mtsai., 1986), amit később ösztrogén receptor alfának (ER α) neveztek el. A géntechnológiai eljárások fejlődésének köszönhetően az ER α knock out (KO) egereken történt vizsgálatok valószínűsítették egy másik ösztrogén receptor jelenlétét is (Lubahn és mtsai., 1993). Valóban 1996-ban Gustafsson laboratóriumában azonosítottak egy másik ösztrogén receptort, amit ösztrogén receptor bétának neveztek el (ER β) (Kuiper és mtsai., 1996; Mosselman és mtsai., 1996; Gustafsson, 1999). Az E2-vel végzett in vitro kötési teszt hasonló kötési aktivitást mutatott az ER α és az ER β esetében (ER α Kd = 0,1 nM, ER β Kd = 0,4 nM)(Kuiper

mtsai.. 1997). és А vizsgálatok azt is kiderítették, hogy ezek a receptorok a hormon receptorokhoz hasonlóan különböző funkcionálisan elkülöníthető alegységekből



2. ábra Az ösztrogén receptorok strukturális egységei. A százalékos értékek az egyes egységek aminosav szekvencia homológiájának a mértékét jelzik az ER α és ER β között. A/B: N-terminális egység, C: DNS kötő egység, D: csukló egység, E: ligand kötő egység, F: kötést, transzaktivációt és transzkripciós faktorokkal való kötődést biztosító egység.

épülnek fel (2. ábra). Ezek: 1. N-terminális egység (A/B), mely a különféle transzkripciós faktorokkal létrejövő interakciót biztosítja. 2. A zinc-f inger proteineket tartalmazó DNS kötő egység (C), mely részt vesz a receptor dimerizációban és a hő sokk fehérjék kötésében is. 3. A csukló egység (D), mely összeköti a C egységet az E-egységgel. 4. ligand kötő egység (E), amely az E2 és az E2 szerű molekulák kötődésén kívül a C terminális részen található F

egységgel együtt biztosítja a transzkripciós faktorokkal való interakciót és a transzaktivációt (Behl, 2002; Gronemeyer és mtsai., 2004). Azon kívül, hogy az ER β kisebb (~59 kDa) az ERα-nál (~67 kDa), két receptor а nagy hasonlóságot mutat a DNS kötő rész aminosav szekvenciájában (97%), de igen eltérő a ligand kötő



3. ábra Az ERα és az ERβ eloszlása rágcsálók agyában. A koronális metszetek sematikus reprezentációin in situ immunhisztokémia alapján készült ERα és ERβ mRNS receptoreloszlás látszik a patkány központi idegrendszerében (a kép Shughrue és mtsai, 1997-es publikációja alapján készült). A számok a Bregmától való távolságot jelzik (Paxinos és Watson, 1982).

(60%) és az N terminális részt tekintve (Mosselman és mtsai., 1996; Kuiper és mtsai., 1997; Tremblay és mtsai., 1997). Annak ellenére, hogy az ER α és az ER β a szervezet szinte valamennyi sejtjében megtalálhatók nagy különbséget mutatnak az expressziós mintázatban pl. a központi idegrendszer tekintetében (3. ábra). A rágcsáló agyban, pl. a hypothalamusban a preopticus területen és a bed nucleus of stria terminalisban, ahol a legtöbb ösztrogén receptor található, az ERα és az ERβ hasonló számban (Shughrue és mtsai., 1996; Shughrue és mtsai., 1997a) fordul elő (3. ábra). A rágcsálókban az ERα dominál a hypothalamus ventromedialis magjában (VMH) és a substantia innominátában (SI) (Shughrue és mtsai., 1997b). A rágcsálók agyában, a hippocampusban, a bulbus olfactoriusban valamint a cortexben túlnyomó többségben ERβ-át találunk (Shughrue és mtsai., 1997b). A neuronokon kívül gliasejteken is leírták az ösztrogén receptorok jelenlétét, melyek feltehetőleg a stabilitás biztosítása mellett részt vesznek a neuronok funkcióinak strukturális neurotranszmissziós jelátviteli szabályozásában is (Garcia-Segura és mtsai., 1989; Torres-Aleman és mtsai., 1992; Santagati és mtsai., 1994; Platania és mtsai., 2003; Mhyre és Dorsa, 2006). Az ERα és az ERβ számos splice variánsa is létezik (Maruyama és mtsai., 1998;

Moore és mtsai., 1998; Petersen és mtsai., 1998; Li és mtsai., 2003) azonban az E2 ezekhez a receptorokhoz jóval gyengébben kötődik, mint a klasszikus ösztrogén receptorhoz.

Az ösztrogén receptorok túlnyomó többségben a sejtmagban fordulnak elő, de hozzávetőlegesen a receptorok 10%-a a membránban illetve a citoplazmában is megtalálható. A membránban található ERα és ERβ scaffolding proteinekhez, pl. caveolin-1-hez, kötve fordul elő a plazmamembrán palackszerű invaginációiban, a caveolákban (Mermelstein és Micevych, 2008; Micevych és Mermelstein, 2008; Mermelstein, 2009). Ezek az ösztrogén receptorok szerkezetükben azonosak a magi ösztrogén receptorokkal.

A sejt membránban található és a klasszikus ösztrogén receptoroktól eltérő receptor családhoz tartozik az ER-X, a g protein kapcsolt receptorok családjába tartózó GPR30 és az STX. Az ER-X egy hozzávetőlegesen 63kDa molekula súlyú receptor, ami funkcionálisan különbözik az ER α -tól és az ER β -tól (Pappas és mtsai., 1995; Toran-Allerand és mtsai., 1999; Toran-Allerand és mtsai., 2002). Érdekes módon ehhez a receptorhoz az E2 inaktív izomerje, a 17 α -ösztradiol nagyobb affinitással kötődik, mint az E2 és nem antagonizálható ösztrogén receptor antagonista ICI 182,780-nal. A western blot vizsgálatok szerint ez a receptor neocorticalis explantátumokban található meg az idegsejt membrán frakciójában, és felnőtt agykérgi neuronokban hypoxiás kondiciók esetén expresszálódik (Toran-Allerand és mtsai., 2002). Ennek a receptornak a pontos szerkezete nem ismert.

A Golgi apparatusban és az endoplazmatikus reticulum membránjában expresszálódó GPR30-ast eredetileg egy Burkitt limfoma sejtvonalon azonosították (Carmeci és mtsai., 1997). Ez a receptor szekvencia homológiát mutat az angiotensin II 1A, interleukin 8A és chemokin 1-típusú receptorral, ami azt jelzi, hogy peptid vagy glükoprotein kapcsolódhat hozzá. Azonban, in vitro vizsgálatokból kiderült, hogy E2 kötődhet a GPR30-hoz (Filardo és mtsai., 2002; Filardo és Thomas, 2005; Revankar és mtsai., 2005). Ezt számos további kísérlet megerősítette és kiderült az is, hogy a receptor az endoplazmatikus reticulumon kívül (Otto és mtsai., 2008a) a neuronok membránjában is megtalálható (Filardo és mtsai., 2002; Gorosito és mtsai., 2008a). Több kutatócsoport kimutatta, hogy az E2 aktivált GPR30 szerepet játszik számos protein kináz indukciójában és az intracelluláris Ca²⁺ jelátvitel modulációjában (Pedram és mtsai., 2006; Brailoiu és mtsai., 2007; Filardo és mtsai., 2007). Azonban ezek a funkcionális eredmények néhol ellentmondásosak és több kutatás számolt be negatív eredményekről (Otto és mtsai., 2008a; Otto és mtsai., 2009). Ezek a vizsgálatok arra utaltak, hogy elképzelhető, hogy a GPR30 önmagában nem, csak a klasszikus ösztrogén receptorokkal, az ERα- és ERβ-val együtt képes kifejteni hatását (Prossnitz és mtsai., 2008).

A GPR30-cal foglalkozó irodalom az ösztrogén szenzitivitásának felfedezése óta nagyot fejlődött és mostanra a receptor új nevet is kapott, G-protein kapcsolt ösztrogén receptor 1 (GPER1) néven szerepel a vizsgálatokban (Nilsson és mtsai., 2011; Prossnitz és Barton, 2011).

Egy másik membrán ösztrogén receptor jelenlétére Kelly és munkatársai hívták fel a figyelmet, amelyhez nem szteroid diphenylacrylamide (2-(4-hydroxyphenyl)-3-phenylpent-2enoic sav, STX) kötődik (Qiu és mtsai., 2003; Qiu és mtsai., 2006) és amely különbözik a klasszikus ösztrogén receptoroktól valamint a GPR30-tól is. Az STX receptorához kötődő E2 a Gαq proteinhez kapcsolt jelátviteli útvonalat aktiválja (Qiu és mtsai., 2006). Az STX 20szor nagyobb affinitással kötődik ehhez a receptorhoz, mint az E2 és nem igényel ERα vagy ERβ aktivációt (Qiu és mtsai., 2006). Azonban az ER-X-hez hasonlóan az STX receptor molekuláris szerkezetét eddig nem sikerült tisztázni.

3.3. Klasszikus genomiális hatások

Az E2 ösztrogén receptorokon keresztül megvalósuló ún. klasszikus direkt genomikus hatásai lassan indulnak be (órák, napok) és hosszú távon fejtik ki hatásukat. Ezekben a folyamatokban az E2 lipofil tulajdonságai miatt könnyedén átlépve a sejt membránon kapcsolódik az ösztrogén receptorokhoz. Az inaktív ösztrogén receptor pontos helye nem ismert, feltehetőleg a citoplazmában található és hő sokk fehérjékhez (Hsp90, Hsp70, Hsp56) valamint chaperon, co-chaperon molekulákhoz kötődik (McEwen és Alves, 1999; Fliss és mtsai., 2000; Norman és mtsai., 2004). A hő sokk fehérjék az ösztrogén receptorok E2-vel való kötődése után létrejövő receptor konformáció változás miatt leválnak a receptorról, aminek következtében a receptor aktiválódik, dimerizálódik és transzlokálódik a sejtmagba (Klinge, 2000; Nilsson és mtsai., 2001). A dimerizált ösztrogén receptor komplex számos magi receptor koaktivátorral interakcióba lép így a 160-KD szteroid receptor koaktivátor proteinnel (P160-nal) vagy a c-AMP response element binding protein (CREB)-binding proteinnel (CBP-vel) (Onate és mtsai., 1995; Chakravarti és mtsai., 1996; Gruber és mtsai., 2002). Az ösztrogén receptor dimer közvetlenül a DNS kötő egységen keresztül kötődik a cél gén DNS szakaszának a promoter regiójában található palindróm szekvenciához, az ösztrogén responsive element (ERE)-hez, vagy a koaktivátorok segítségével transzkripciós faktorokon keresztül (AP-1, CREB) közvetetten hat az adott gén transzkripciójára (O'Lone és mtsai., 2004).

3.4. Az E2 nem-klasszikus intracelluláris és membrán hatásai

A közvetlen genomiális hatáson kívül az utóbbi évtizedekben ismertté vált egy jóval gyorsabb akár másodperceken belül létrejövő mechanizmus, amit az E2 az ioncsatornákon és az intracelluláris jelátviteli molekulákon keresztül valósít meg. Ezeket a hatásokat az irodalom eleinte nem-genomiális hatásként aposztrofálta. Azonban ez az elnevezés félrevezető, mivel az intracellularis jeláviteli folyamatok a sejtmagban genomiális hatásokhoz vezetnek. Ezért a továbbiakban ezeket az E2 indukálta gyors folyamatokat indirekt genomiális vagy nem-klasszikus hatásoknak hívjuk.

A nem-klasszikus E2 folyamatokban az első bizonyítékot Szegő és Davis munkája adta (Szego és Davis, 1967), amelyben kimutatták, hogy az E2 adása után 15 másodpercen belül szignifikánsan növekszik a cAMP szint az uterusban. Későbbiekben bizonyították azt is, hogy a cAMP-hez kapcsolódó intracelluláris jelátvivő molekulák, így a protein kináz A (PKA) is gyorsan aktiválódik E2 hatására (Muchekehu és Harvey, 2008). Ezen kívül az E2



4. ábra A nem-klasszikus ösztrogén hatások lehetséges mechanizmusai a cAMP response element binding protein (CREB) foszforilációt szabályozó intracelluláris jelátvivő rendszereken. Rövidítések: PKA: protein kináz A, MAPK: mitogen-activated protein kináz, GPER1:G-protein kapcsolt ösztrogén receptor 1, Sos: son of sevenless, Grb-2: growth factor receptor-kötött protein 2, E2: 17 β ösztradiol, CaM: calmodulin, CaMKII: kalcium kalmodulin kináz II, ERK1/2: extracellular signal regulated kináz, mGluR1: metabotróp glutamát receptor 1, PI3K foszfatidilinositol-3-OH kináz, TrkA: tropomyosinhoz kapcsolt kináz A, VSCC: feszültség függő Ca²⁺ csatorna.

gyorsan aktiválja a mitogen activated protein kináz (MAPK) jelátvivő rendszert az intracelluláris jelátvivő molekuláin keresztül, mint az Sos, Ras, Raf és az extracelullar regulated kinase1/2 (ERK1/2) valamint aktiválja a kalcium kalmodulin kinázt (CaMKII) és a foszfatidilinositol-3-OH kinázt (PI3K) (Gu és Moss, 1996; Kelly és mtsai., 1999; Chappell és mtsai., 2000; Simoncini és mtsai., 2000; Wade és Dorsa, 2003; Bryant és mtsai., 2005). A nem-klasszikus E2 jelátvitel végpontjaiban lévő kulcsfontosságú transzkripciós faktor a CREB (4. ábra). A CREB akkor aktiválódik, amikor foszforilálódik (pCREB) (a 133-as helyen lévő szerin, három foszforilációs hely közül az egyik legjellemzőbb a molekula aktivációja esetén)(Shaywitz és Greenberg, 1999). A foszforilált CREB homodimerizálódik vagy heterodimért alkot a cAMP response element modulatorral (CREM) vagy az ATF-1-gyel és így kötődik a DNS-en lévő cAMP responsive elementhez (CRE) (Shaywitz és Greenberg, 1999). Több vizsgálat bizonyította, hogy az E2 képes foszforilálni a CREB-et (Gu és Moss, 1996; Zhou és mtsai., 1996).

A Ca²⁺ központi szerepet játszik a PKA, az ERK1/2 és a CREB aktivációjában (Shaywitz és Greenberg, 1999). Elektrofiziológiai és képalkotó Ca²⁺ mérések megmutatták, hogy az E2 képes az intracelluláris Ca²⁺ szint emelésére, mely magyarázatot szolgáltathat a PKA-ERK1/2-CREB jelátvivő rendszerek aktivációjára is (Aronica és mtsai., 1994; Gu és Moss, 1996; Chaban és mtsai., 2004).

A jelátvivő rendszerek aktivácójának másik fontos komponense a membrán depolarizációja. Yaginak és Kelly-nek az 1970-es években végzett úttörő jellegű egy-sejt elektrofiziológiai munkái óta tudjuk, hogy az E2 gyors nem-klasszikus hatást gyakorol a preopticus és septalis területen lévő neuronok membrán potenciáljára és akciós potenciáljának ferekvenciájára (Yagi, 1973; Kelly és mtsai., 1976). Ezen kívül számos kutató kimutatta az E2 nem-klasszikus hatását ioncsatornákon illetve receptorokon, mint pl. a G-protein-kapcsolt, inward rectifier kálium csatornán, N-methyl-D-aszpartát (NMDA) receptoron, kainát receptoron, a GABA_B vagy μ-opioid receptoron (Lagrange és mtsai., 1996; DeFazio és Moenter, 2002; Nishimura és mtsai., 2008; Kelly és Qiu, 2010).

A nem-klasszikus E2 szignalizáció egyik fontos kérdése már több mint harminc éve, hogy mely receptorok felelősek az E2 gyors hatásaiért. Toran Allerand munkatársaival igazolta, hogy a neocorticalis explantátumokban az ER-X aktivációja a MAPK szignálrendszer aktivációjához vezet az ERK1/2 foszforilációján keresztül (Nethrapalli és mtsai., 2001; Setalo és mtsai., 2002; Toran-Allerand, 2006). Paul Merlmelstein kutatócsoportja, hippocampalis tenyészeten megmutatta, hogy az 1-es típusú metabotrop glutamát receptorok (mGluR1) aktiválódnak az idegsejt membrán caveolin rendszerében a

caveolin-1-hez kötődő ERα-án keresztül, mely aktiváció végső soron a CREB foszforilációjához vezet (Boulware és mtsai., 2005; Boulware és mtsai., 2007). Ezeket a kísérleteket javarészt in vitro körülmények között végezték, ezért az ösztrogén receptorok in vivo, nem-klasszikus E2 jelátviteli szerepéről igen keveset tudunk.

Korábbi sejtmembrán impermeábilis E2-vel végzett kísérletek megmutatták, hogy a membrán ösztrogén hatások feltehetőleg részt vesznek az olyan szexuális magatartásformák kialakításában, mint a lordózis (Kow és Pfaff, 2004). A gerincvelő dorsalis ganglion sejtjeinek *in vitro* vizsgálata valószínűsítette azt is, hogy az E2 a P2X purinerg receptorra gyakorolt nem-klasszikus hatásain keresztül részt vehet a nocicepcio modulációjában (Micevych és Dominguez, 2009). Azonban a központi idegrendszerben az E2 nem-klasszikus hatásmechanzimusának fiziológiai jelentősége korántsem tisztázott, ezért további vizsgálatokat igényel.

3.5. Az ösztrogén központi idegrendszeri hatásai: a nemi dimorfizmustól a neuroprotekcióig

Az ösztrogének számos hatással rendelkeznek a központi idegrendszerben a születéstől kezdve egészen az idős korig. Az ösztrogének részt vesznek az agy nemi differenciálódásának szabályozásában a klasszikus magi ösztrogén receptoron keresztül (Auger és mtsai., 2000; McEwen, 2002) . Ezt a differenciálódást egyrészt a tesztoszteron neonatális szintjének emelkedése okozza, mely a hímekben átlépve a vér-agy gáton egyrészt a tesztoszteron receptorokhoz kötődik másrészt az aromatáz enzim hatására E2-vé alakul (Naftolin, 1994; McEwen, 2002). Mivel a hím agy is tartalmaz ösztrogén receptorokat, így érdekes módon a hím agya előbb érzékeli az E2-t, mint a nőstényeké és ez az agyi struktúrák defeminizációjához és maszkulinizációjához vezet (McEwen, 2002). A hypothalamus funkcionális és strukturális nemi dimorfizmusa mellett a magasabb szintű kognitív központok, a basalis előagy, a limbikus rendszer, (pl. sexual dimorphic nucleus) működése is mutat nemi különbségeket (McEwen és Alves, 1999). Az E2 szabályozza a basalis előagy, a hippocampus, az agykéreg, a striatum, az agytörzsben a locus coeruleus és a gerincvelő működését (Fischette és mtsai., 1984; Kimura, 1992; Bazzett és Becker, 1994; Witelson és mtsai., 1995). Ezáltal az E2 részt vesz a kognició, a hangulat, a lokomóció és a fájdalom szabályozásában is (McEwen és Alves, 1999).

Az E2 jól ismert, jelentős neuroprotektív potenciállal rendelkezik. In vitro mérésekben sejttenyészetekben és sejtvonalakon végzett vizsgálatokban (kolinerg SN56-os sejtek, PC12-es sejtek, hippocampalis tenyészetek) kimutatták, hogy az E2 hatékonyan képes kivédeni az indukált sejthalált (Zaulyanov és mtsai., 1999; Marin és mtsai., 2003b; Amantea

és mtsai., 2005). A klinikai megfigyelésekből kiderült, hogy szex dimofrizmus figyelhető meg a különböző neurodegeneratív megbetegedések előfordulásában, mint a stroke, az Alzheimer kór, a Parkinson betegség, ami az E2 neuroprotektív tulájdonságait hangsúlyozza (Leranth és mtsai., 2000; Maccioni és mtsai., 2001; Saunders-Pullman, 2003; Baum, 2005). A korábbi vizsgálatokból az is nyílvánvalóvá vált, hogy az E2 csökkenti az Alzheimer kórban megfigyelhető neurodegenerációt. In vitro sejtvonalon és transzgenikus Alzheimer egér modelleken végzett kutatások kimutatták, hogy Alzheimer kórban, az agyban megfigyelhető amyloid béta (Aβ) protein aggregációjának toxikus hatásait az E2 képes gyengíteni (Zheng és mtsai., 2002; Marin és mtsai., 2003a). Az E2 igen hatékonynak mutatkozott az ischaemiás agykárosodásokkal szemben is (Dubal és mtsai., 2001). Ösztrogén receptor KO egereken folytatott kísérletekből kiderült, hogy az E2 előkezelés az ERα-án keresztül csökkentette az arteria cerebri media okklúzióját követő sejthalált (Dubal és mtsai., 2001).

Az in vivo állatkísérletek és az in vitro mérések azt sugallták, hogy az E2 neuroprotektív tulajdonságaiért javarészt az E2 nem-klasszikus mechanizmusai tehetők felelőssé (Marin és mtsai., 2003a; Guerra és mtsai., 2004). Ezekben a folyamatokban az E2 indukálta MAPK aktiváció és a CREB foszforiláció játszhat kulcsszerepet (Singer és mtsai., 1999; Dominguez és mtsai., 2004; Srivastava és mtsai., 2008). A CREB transzkripciós faktorként aktiválja egy sor olyan génnek az átírását, melyek jelentős szerepet játszanak a citoprotekcióban, így az antiapoptotikus proteinek átírásában, mint pl. a Bcl-2 vagy a Bcl-x (Shaywitz és Greenberg, 1999; Walton és Dragunow, 2000).

Az ösztrogének sejteket védő tulajdonságainak tárgyalásánál, mindenképpen meg kell említeni a fitoösztrogéneket, mivel táplálékunk szerves alkotórészeiként jelentős hatást gyakorolnak szervezetünk működésére és interferálhatnak az endogén E2 hatásaival. A szója az egyik legtöbbet használt fitoösztrogén forrás az emberi táplálkozásban, a csecsemő tápszerek alapvető alapanyaga. A szója nagy mennyiségben tartalmaz isoflavinoid fitoösztrogéneket, mint pl. a genistein (Setchell és mtsai., 1998). A genisteinnek jól ismertek a sejtet védő hatásai, mint pl. a szervezet szinte valamennyi sejtjét érintő anti-carcinogén hatás (Barnes, 1995). Ezzel szemben azonban a posztnatális genistein expozició hatással van az agy szexdifferenciálódására és a szexuális magatartásformák kialakulására (Patisaul és Polston, 2008). A kísérletek megmutatták, hogy a genistein megváltoztatja a szexdimorfizmussal rendelkező idegsejt hálózatok működését és hatással van a gén transzkripcióra a hypothalamusban (Patisaul és mtsai., 2002). A genistein ösztrogénszerű hatását ösztrogén receptorokon keresztül valósítja meg (Patisaul és mtsai., 2002), azonban a fejlődő agyra gyakorolt molekuláris hatásmechanizmusa nem ismert.

Az ösztrogének protektív tulajdonságai jó alapot szolgáltattak a posztmenopauzalis korban fellépő problémák kezeléséhez. Azonban az utóbbi évtizedben az egyik legátfogóbb Women's Health Initiative (WHI) ösztrogén kezeléssel foglalkozó multicenter klinikai vizsgálatsorozata kimutatta, hogy a hormonpótló terápia (HPT) korántsem veszélytelen. Ezeket a vizsgálatokat több mint 160 ezer posztmenopauzális korban (50-79 év) lévő nőn végezték az Egyesült Államokban, 1993-tól 2002. július 8-ig, amikor is a vizsgálatokat a kezelés alatt fellépő komoly mellékhatások miatt leállították. Konjugált ösztrogén és egy szintetikus progeszteron készítmény krónikus alkalmazása során ugyanis kiderült, hogy a kezelés emelte a dementia, a stroke és a mélyvénás trombózis kialakulásának a rizikóját, valamint növelte a rosszindulatú melldaganatok és szív-koronária betegségek megjelenésének valószínűségét posztmenopauzális korban lévő nőkön (Rossouw és mtsai., 2002; Shumaker és mtsai., 2003). Ezek az eredmények arra késztették a világ ösztrogén kutatást folytató laboratóriumait, hogy több hangsúlyt fektessenek az E2 hatásmechanizmusainak jobb megértésére. Ezért az addig kevésbé kutatott területek, így például a nem-klasszikus hatások, megismerését egyre több kutatócsoport tűzte zászlajára, amely kutatási irányhoz mi is csatlakoztunk. A központi idegrendszerben az E2 nem-klasszikus hatásait egy-sejt szinten kezdtük el tanulmányozni és két neuronális fenotípust szemeltünk ki, a GnRH neuronokat és a kolinerg sejteket.

3.6. Az E2 és a GnRH neuronok

A GnRH egy 10 aminosavból álló dekapeptid, melyet az 1970-es években Roger Guillemin és Andrew Schally azonosított (Amoss és mtsai., 1971; Schally és mtsai., 1971), és amiért 1977-ben megkapták az orvosi Nobel díjat. A GnRH-nak eredetileg a luteinizáló hormon releasing hormon (LHRH) nevet adták, mivel ez a hormon fokozza a hipofízis elülső lebenyében a gonadotropin szekréciót. A GnRH dekapeptid számos formáját ismerjük (GnRH-1, GnRH2, GnRH-3) (Sherwood és mtsai., 1993; Belsham és Lovejoy, 2005). Egyedül a GnRH-1-ről tudott, hogy szabályozza a fertilitást, a GnRH-2 és a GnRH-3 nem vesz részt ebben (Jimenez-Linan és mtsai., 1997; Grove-Strawser és mtsai., 2002). Vizsgálatainkat a GnRH-1-et expresszáló neuronokon végeztük, amit a továbbiakban GnRH neuronoknak hívok.

A GnRH neuronok a fertilitás központi idegrendszeri szabályozásának "processzor sejtjei", melyek képesek a külvilágból és a szervezet homeosztatikus szabályozásának visszacsatolásaiból érkező információ feldolgozásával a reprodukció szabályozására. Számuk

dc_474_12

felnőtt rágcsáló agyában egy mindössze 800-1300-ra tehető és Hoffman. (Wray 1986; Merchenthaler és mtsai., 1989). A GnRH neuronok az egyedfejlődés során a központi idegrendszeren kívül keletkeznek a 11. napon és az embrionális fejlődés során az orr placodból vándorolnak а basalis előagy területére (Schwanzel-Fukuda és Pfaff. 1989; Wray és mtsai., 1989; Kim és mtsai., 1999). Rágcsálókban a születés ideje körül elfoglalják a



5. ábra A hypothalamus-hipofízis-gonád (HHG) tengely. A sematikus ábra a HHG tengely hormon visszacsatolásait mutatja az ovárium működésének különböző stádiumaiban.

helyüket a központi idegrendszerben, amit igen elszórt elhelyezkedés jellemez. A GnRH neuronok a következő anatómiai helyeken találhatóak a központi idegrendszerben felnőtt korban: medial septum (MS), rostral preopticus area (rPOA), melyben az organum vasculosum lamina terminalis (OVLT) az egyik legjellemzőbb terület és az anterior hypothalamicus area (AHA) (Jennes és Stumpf, 1986; Silverman és mtsai., 1987). A GnRH neuronok bipolaris idegsejtek és axonjuk hossza meghaladhatja akár az 1000 µm-t is (Campbell és mtsai., 2005). A jelenlegi dogma szerint a GnRH neuronok axon terminálisai az eminentia mediana külső részébe projiciálnak és itt pulzatilisen szekretálják a GnRH-t a hipofizis portális vénarendszerébe, mely a hipofizis elülső lebenyébe juttatja el a dekapeptidet (Lehman és mtsai., 1986). A GnRH a gonadotrop sejtek GnRH receptoraihoz kötődve irányítja a luteinizáló hormon (LH) és a folliculus stimuláló hormon (FSH) szintézisét és pulzatilis szekrécióját (Haisenleder és mtsai., 1991). Megjegyzendő, hogy a GnRH neuronok egy része az OVLT-be projiciál, ami a vér-agy gáton kívül esik, egy másik részük a bednucleus stria terminalisba illetve a hippocampusba küldi az axon végződéseit (Witkin és mtsai., 1982; Merchenthaler és mtsai., 1984; Jennes és Stumpf, 1986). A GnRH neuronok mintegy 30%-a projiciál az eminentia mediana-ba, ami bizonyára elegendő is, mivel a kísérletek szerint a GnRH neuronoknak mindössze 12-34%-a szükséges ahhoz, hogy a fertilitást irányítsa (Herbison és mtsai., 2008).

A hipofízis elülső lebenyéből pulzatilisen felszabaduló LH és FSH a gonádokon hatva fokozza az ovariális szteroidszintézist és a follikulogenezist, valamint a szex szteroidok

szekrécióját, aminek az egyik legfontosabb képviselője az E2. A hypothalamustól a hipofízisen át a gonádokig terjedő kommunikációs tengelynek (HHG tengely) az egyik legkritikusabb eleme a GnRH termelés és az ovulációt kiváltó LH hullámnak ("surge") E2-től függő szabályozása. A GnRH neuronok által alkotott idegsejt hálózat szinkronizált, pulzatilis aktivitását és ez által a HHG tengely működését az E2 GnRH neuronokra gyakorolt visszacsatoló hatása szabályozza (5. ábra). A GnRH neuronok pulzatilis aktivitását az E2 negatív visszacsatolás tartja "féken". Hím rágcsálókban a tesztoszteronból aromatáz enzim hatására az agyban létrejövő E2 állandó negatív visszacsatolás révén folyamatosan gátolja a GnRH neuronok pulzatilis működését. Nőstény egerekben és patkányokban az ösztrusz ciklus nagy részében az E2 gátolja a GnRH neuronokat (Park és Ramirez, 1989) (6. ábra). A proösztruszhoz közeledve azonban az E2 koncentrációja megnő és a negatív visszacsatolás pozitívba csap át, mely jelentős GnRH és ennek következtében LH koncentrációnövekedést, hullámot ("surge"-et), produkál és így létrehozza az ovulációt (Sarkar és mtsai., 1976; Moenter és mtsai., 1993) (6. ábra). Habár az értekezés az E2 hatásaira öszpontosít, meg kell említeni a progeszteron szerepét ebben a szabályozásban. A progeszteront a corpus luteum termeli az ösztrusz ciklus proösztrusz szakaszában rágcsálókban (az ovulációs ciklus luteális fázisában primátákban) (Bailey, 1987). A progeszteron pozitív visszacsatolásban betöltött szerepe nem mondható tisztázottnak, mivel az adatok igen ellentmondóak (Dierschke és mtsai., 1973; Levine és Ramirez, 1980). Ezzel szemben elképzelhető, hogy negatív visszacsatolással szabályozza a HHG tengely működését, amivel megakadályozza egy addicionális surge megjelenését közvetlenül az ovuláció után. A HHG tengelyre gyakorolt hatása E2 függő, mivel számtalan fajban az E2 szint növekedés emeli a progeszteron expresszióját receptorok

(MacLusky és McEwen, 1978; Bethea és mtsai., 1996; Scott és mtsai., 2000).

A GnRH neuronok képesek közvetlen E2 recepcióra, mivel az ösztrogén receptorok közül ERβ-át és GPER1-et (régi nevén GPR30-at) is



6. ábra Az E2 és a GnRH szintek sematikus ábrázolása intakt és ovariektomizált (OVX) rágcsálókban. A kékkel jelzett területek az E2 és a GnRH koncentráció változásait mutatják negatív ösztrogén visszacsatolásban, ami fenntartja a pulzatilis GnRH szekréciót. A pirossal jelzett területek a pozitív visszacsatolást reprezentálják. A magas és kitartott E2 koncentráció szükséges a GnRH "surge"-hez. Az ábra Herbison 1998 Endocrin Reviews-ban megjelent ábrájának módosított változata.

expresszálnak (Hrabovszky és mtsai., 2007; Terasawa és mtsai., 2009). Megjegyzendő hogy a GPR1-et csak primatákban mutatták ki, rágcsálók GnRH neuronjában nem sikerült tisztázni a szerepét (Sun és mtsai., 2010). Érdekes módon az E2 visszacsatolása jelenlegi tudásunk szerint nem közvetlenül a GnRH neuronokon, hanem közvetett módon az interneuronokon keresztül valósul meg. A transzgenikus egereken végzett vizsgálatok kiderítették, hogy az E2 pozitív visszacsatoló hatásait a III. agykamra rosztrális periventrikuláris területén található ERα-t expresszáló GnRH neuronokra projektáló kisspeptin tartalmú neuronok közvetítik (Wintermantel és mtsai., 2006). A pozitív visszacsatolással ellentétben a negatív visszacsatolás molekuláris hatásmechanizmusát, valamint a GnRH neuronokban lévő ösztrogén receptorok szerepét idáig nem sikerült tisztázni. A képet tovább bonyolítja az, hogy a negatív visszacsatolásban az E2-nek közvetelnül a hipofizisre gyakorolt hatása is szerepet játszhat (Gieske és mtsai., 2008; Singh és mtsai., 2009). Az ösztrogén receptor KO egereken végzett kísérletek alapján elképzelhető, hogy az ösztrogén a klasszikus ER α -án és ER β -án keresztül fejti ki a negatív visszacsatolását a GnRH neuronokon (Couse és mtsai., 2003; Dorling és mtsai., 2003). Az utóbbi években ugyancsak KO egerekkel végzett kísérletek a nem-klasszikus ösztrogén hatások szerepére hívták fel a figyelmet ebben a folyamatban. Glidewell-Kenney és munkatársai 2007-ben publikáltak az ösztrogén visszacsatolásról egy olyan kísérletsorozatot, ahol egy olyan egértörzset (ER $\alpha^{-/AA}$ egereket) használtak, amelyben az ERα nem tudott kötődni az ERE-hez ezáltal a sejtekben az ERE független nem-klasszikus ERα mediálta jelátvitel volt csak jelen (Glidewell-Kenney és mtsai., 2007). Ezekben a kísérletekben az ER $\alpha^{-/AA}$ egerekben az ösztrogén negatív visszacsatolása nem változott, mivel a basalis LH szint és az ovariektómia indukálta LH szint emelkedés ugyanolyan értéket mutatott, mint a vad típusú kontroll egerekben. Ezen kívül az ovariektómia kiváltotta LH szint emelkedést az E2 hatékonyan csökkentette az ER $\alpha^{-/AA}$ egerekben, mely ugyancsak az ösztrogén negatív visszacsatolásának meglétére utalt. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy az ER $\alpha^{-/AA}$ egerekben az ösztrogén pozitív visszacsatolása nem működött, mivel nem találtak LH surge-et, spontán ovulációt és ösztrusz ciklust ezekben az egerekben. A nem-klasszikus hatásoknak az ösztrogén visszacsatolásában betöltött szerepére hívják fel a figyelmet az elektrofiziológiai eredmények is. Ezekben a túlélő agyszeleteken végzett egy-sejt elektrofiziólógiai kísérletekben azt figyelték meg, hogy az E2 alacsony dózisa depolarizálja, magas dózisa hyperpolarizálja a GnRH neuronokat (Chu és mtsai., 2009).

3.7. Az E2 és a basalis előagyi kolinerg neuronok

Kísérleteinkben az E2 hatás vizsgálatának másik célcsoportja a kolinerg neuronok voltak. A kolinerg rendszer az egyik legfontosabb és legkiterjedtebb neurotranszmitter rendszer a központi idegrendszerben (Lewis és Shute, 1967). A kolinerg neuronok túlnyomó többsége a basalis előagyban található. A basalis előagyi kolinerg (BEK) rendszert négy anatómiai régió alkotja: az MS, a Brocaféle ventrális és horizontális diagonális



7. ábra. A sematikus ábra a kolinerg projekciókat mutataja a basalis előagyban. MS: medialis septum, SI/NBM: nucleus basalis magnocellularis és substantia innominata complex. HDB: horizontális diagonális köteg, VDB: ventrális diagonális köteg, OB: bulbus olfactorius, H: hippocampus. Az ábra Mesulam és mtsai-nak 1983-as publikációjában megjelent ábrájának a módosított változata.

köteg (VDB és HDB) valamint a nucleus basalis magnocellularis és substantia innominata complex (SI/NBM; ezt a neuroanatómiai struktúrát Meynert magnak nevezik az emberi agyban) (Mesulam és mtsai., 1983b; Mesulam és mtsai., 1983a) (7. ábra). Annak ellenére, hogy az SI/NBM anatómiailag tovább osztható hat területre, az alábbi vizsgálatainkban az SI/NBM elnevezést használjuk, és nem különítjük el ezeket az alegységeket egymástól.

A kolinerg neuronok neurotranszmittere az acetilkolin (Ach), melyet acetil-koenzim A-ból (acetil-CoA) és kolinból állítanak elő ezek a neuronok kolinacetil transzferáz (ChAT) enzim segítségével (Tucek, 1985). Az Ach molekulát az acetilkolinészteráz (AchE) enzim bontja acetil-CoA-ra és kolinra, amely molekulák felvételre kerülnek a kolinerg neuronokba (Ravin és mtsai., 1953; Tucek, 1985). A ChAT és az AchE fontos molekuláris markerek a kolinerg neuronok központi idegrendszeri kimutatásában.

Molekuláris nyomjelző technikák alkalmazásával megmutatták a BEK neuronok projekciós területeit (Luiten és mtsai., 1987; Hreib és mtsai., 1988). Az MS és a VDB projekciók a "kolinerg limbikus rendszer" nevet viselik, mely egyértelműen ezen struktúrák hippocampus-szal meglévő szoros kapcsolatára utal (Lewis és Shute, 1967). Retrográd nyomjelző technikával készült anatómiai tanulmányok megmutatták, hogy a HDB-ben lévő kolinerg neuronok a bulbus olfactoriusba projiciálnak (Kitt és mtsai., 1987; Zaborszky és mtsai., 1999). Az SI/NBM komplex kolinerg neuronjai a cortexbe és az amygdalába küldik a rostjaikat (Van Hoesen és mtsai., 1976; Lehmann és mtsai., 1980; Boegman és mtsai., 1992). Az SI/NBM unilateralisan idegzi be az agykéreg szenzoros és motoros területének valamennyi rétegét (Pearson és mtsai., 1983; Walker és mtsai., 1985; Kitt és mtsai., 1987). A kolinerg léziós kísérletek bebizonyították, hogy a BEK neuronok jelentős szerepet játszanak a

memória és a tanulás folyamataiban és a figyelem kialakításában (Wenk és Willard, 1998; Zaborszky és mtsai., 1999). A cortexbe projiciáló kolinerg neuronokról az is kiderült, hogy nagy szerepet játszanak a kortikális idegsejt hálózatok funkcionális integritásának fenntartásában (Conner és mtsai., 2005).

A BEK neuronok jelentős pusztulást mutatnak bizonyos neurodegeneratív megbetegedésekben, mint pl. az Alzheimer kór (Whitehouse és mtsai., 1982; Coyle és mtsai., 1983; Wenk és Willard, 1998). Post mortem Alzheimeres minták vizsgálata egyértelműen jelezte a kolinerg aktivitás csökkenését a cortexben és a hippocampusban, mely az MS-ben és SI/NBM-ben bekövetkező kolinerg neuronok pusztulásának volt köszönhető (Perry és mtsai., 1978; Gaykema és mtsai., 1991). Alzheimer kórban a kolinerg neuronok pusztulása a betegségben megjelenő toxikus amyloid- β (A β) plakkokkal hozható összefüggésbe (Harkany és mtsai., 1995; Auld és mtsai., 2002). Az A β képes csökkenteni az ACh szintézist és szekréciót (Whitehouse és mtsai., 1982; Lehericy és mtsai., 1993). Ezen kívül az N-methyl-D-aszpartát (NMDA) receptoron keresztül növeli a Ca²⁺ beáramlást, ami a kolinerg sejtek pusztulásához vezet (Harkany és mtsai., 2000). Megjegyzendő, hogy a kolinerg neuronok degenerációja nem csak Alzheimer kórban, hanem Parkinson kórban, Jakob Creutzfeld betegségben és traumatikus fejsérüléseknél is kimutatható (Whitehouse és mtsai., 1983; Arendt és mtsai., 1984; Bohnen és mtsai., 2003; Salmond és mtsai., 2005).

A BEK neuronok funkcióinak modulátora és egyik legjelentősebb "védelmezője" az E2. Ennek hatásnak a molekuláris alapjait BEK neuronok ismert ERα expressziója teremtheti meg (Shughrue és mtsai., 2000; Kalesnykas és mtsai., 2005). Az E2 képes befolyásolni a BEK neuronok morfológiáját, neurokémiai és elektrofiziológiai tulajdonságait. Ovariektómiát követő E2 kezelés képes növelni a kolinerg neuronok sejttestének méretét a HDB-ben és az SI/NBM-ben, továbbá növeli e neuronok neuritjainak hosszát és elágazódásának mértékét is (Dominguez és mtsai., 2004; Saenz és mtsai., 2006; Ping és mtsai., 2008). Gibbs kutatócsoportja kimutatta azt is, hogy az E2 alkalmazása emeli az Ach szintézist a BEK neuronokban a ChAT enzim experssziójának és aktivitásának emelésén keresztül (Gibbs és mtsai., 1994; Gibbs és mtsai., 1997; Gibbs és Aggarwal, 1998). Túlélő agyszeleten végzett elektrofiziológiai vizsgálatokkal és 192IgG-Saporin, cholintoxin segítségével történt szelektív kolinerg léziós kísérletekkel kiderítették, hogy a hippocampus CA1-es piramis sejtjeire gyakorolt E2 kiváltotta dezinhibicióért a septo-hippocampalis BEK neuronok tehetők felelőssé (Rudick és mtsai., 2003).

A morfológiai, neurokémiai és elektrofiziológiai hatások mellett a legszembeötlőbb az E2-nek azon tulajdonsága, hogy védi az BEK neuronokat a neurodegeneratív hatásokkal

szemben. In vitro vizsgálatok ugyanis igazolták, hogy az Aβ-indukálta sejthalál esetén, az SN56 septalis kolinerg sejtvonalban, az E2 jelentős neuroprotektív potenciállal rendelkezik (Marin és mtsai., 2003a). Patkányokon végzett in vivo kísérletek kimutatták, hogy az E2 helyreállította a kolinerg rendszer szinaptikus integritását a cortexben az SI/NBM-be adott NMDA injekció által indukált kolinerg sejthalált követően (Horvath és mtsai., 2002). Az E2 BEK neuronokra gyakorolt neuroprotektív hatásai bár kulcsfontosságúak, a mechanizmus nem tisztázott. A BEK neuronok expresszálják a magas nerve growth faktor (NGF) affinitású tropomyosinhoz kapcsolt kináz A (TrkA) receptort és a brain derived neurotrophin factor (BDNF) receptorát a TrkB-t (Nonomura és Hatanaka, 1992; Sobreviela és mtsai., 1994). Ezek a neutrofin receptorok kulcsszerepet játszanak a BEK neuronok embrionalis fejlődésében és túlélésében felnőtt korban (Thoenen és mtsai., 1987; Hartikka és Hefti, 1988; Sohrabji és Lewis, 2006). Korábbi vizsgálatok felvetették, hogy az ösztrogén a neutrophin jelátviteli rendszeren keresztül fejti ki protektív hatásait. Gibbs kísérletei megmutatták, hogy az E2 képes a TrkA receptor protein és a BDNF mRNS-nek az expresszióját növelni (Gibbs, 1998). Néhány kísérlet arról is beszámolt a BEK neuronok projekciós területén, a hippocampusban, hogy az E2 szint változása pozitív korrelációt mutatott az NGF koncentráció alakulásával (Bora és mtsai., 2005; Franklin és Perrot-Sinal, 2006). Az E2 által a BEK neuronokra kifejtett neuroprotekció hatásmechanizmusa azonban nem ismert.

4. Célkitűzés

Kísérleteink alapvető célkitűzése tehát, hogy meghatározzuk az ösztrogén nemklasszikus hatásainak mechanizmusát és fiziológiai jelentőségét a központi idegrendszerben, különös tekintettel a kolinerg és a GnRH neuronokra. Vizsgálatainkban immunhisztokémiát, konfokális lézer szkenning mikroszkópiát, egy-sejt elektrofiziológiát, képalkotó egy-sejtes Ca²⁺ méréseket, transzgenikus technológiát és élő sejten megvalósuló egy molekula detekciós mikroszkópiát alkalmaztunk.

4.1. Célkitűzéseink részletezése

- A CREB és az ERK1/2 foszforilációját indikátorként használva feltérképezzük az ösztrogének gyors hatásait a központi idegrendszerben és megvizsgáljuk a folyamat klasszikus ösztrogén receptor függőségét.
- 2. Megvizsgáljuk az E2 nem-klasszikus hatásait a CREB foszforilációra és ennek mechanizmusát a GnRH neuronokon.
- 3. Meghatározzuk a CREB szerepét az E2-nek a GnRH neuronra gyakorolt negatív visszacsatolásában.
- 4. Megvizsgáljuk az E2-indukálta nem-klasszikus jelátviteli folyamatokat basalis előagyi kolinerg neuronokon.
- Meghatározzuk az E2 neuroprotektív hatását és megvizsgáljuk a nem-klasszikus folyamatok szerepét az E2-indukálta neuroprotekcióban basalis előagyi kolinerg neuronokon.

5. Metodika

<u>5.1. Állatok</u>

Kísérleteinket fiatal felnőtt (6-9 hetes) hím/nőstény egereken (C54BL/6) valamint transzgenikus és knock out (KO) egereken és nőstény Wistar patkányokon (két hetes) végeztük. Szem előtt tartottuk az adott intézmény és ország állatvédelmi követelményeit ("The Babraham Institute Animal Welfare and Ethics Committee" rendelkezései; a magyar EU konform törvény az állatvédelemről és a kísérletekről (1998, XXVIII, 243 cikkely/1998); "Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching" rendelkezései). Kísérleteinkben a következő transzgenikus és KO egereket használtuk:

1. Globális ösztrogén receptor KO (13)

Ezek az egerek őssejtes homológ rekombináción alapuló knock out technológiával készültek, így az egerek szervezetének valamennyi sejtjéből hiányzik az ER α (ER α KO) vagy az ER β (ER β KO) vagy mindkettő receptor (ER α /ER β KO) (Krege és mtsai., 1998; Antal és mtsai., 2008).

2. ChAT-GFP, GnRH-GFP (9, 17)

Ezekben az egértörzsekben a GFP, a GnRH vagy a ChAT gén promoter régiójának kontrollja alatt expresszálódik (Spergel és mtsai., 1999; Tallini és mtsai., 2006). Ezáltal a GnRH és a kolinerg neuronok endogén zöld fluorescenciát mutatnak 488 nm hullámhosszú fény alkalmazása esetén. Előkísérleteink megmutatták, hogy a GnRH-GFP állatokban minden GFP tartalmú sejt tartalmaz GnRH-t az MS-ben ill. az rPOA-ban. Ugyancsak minden GFP neuron kolinerg neuron is egyben a ChAT-GFP állatokban. Ezek az egerek pronukleáris injekciós transzgén technológiával készültek.

3. *Pericam-GnRH* (9)

Ez az egértörzs egy raciometrikus genetikailag kódolt kálcium indikátort, cirkuláris zöld fluorescein protein-kalmodulint (raciometrikus pericam) (Nagai és mtsai., 2001) expresszál, ami a GnRH gén promoter régiójának kontrollja alatt áll ezért a pericam a GnRH neuronban expresszálódik (Jasoni és mtsai., 2007). Az egerek a GFP egerekhez hasonlóan pronuklearis injekciós transzgén technológiával készültek (Jasoni és mtsai., 2007). A preciam-GnRH és az ERβKO állatok keresztezéséből származó egereket (preciam-GnRH/ERβKO) is használtuk kísérleteinkben, amelyekben a GnRH neuronok pericamet expresszáltak, de nem tartalmaztak ERβ-át.

4. Neuron specifikus-ERa KO (nERaKO)(5)

Ezeket az egereket LoxP-Cre génszabászati technológiával állítottuk elő (Nagy, 2000). Az ERα gén III. exonján lévő LoxP szekvenciákkal rendelkező egeret (LoxP-ERα) (Wintermantel és mtsai., 2006) kereszteztük olyan egerekkel, melyekben a calmodulindependent protein kinase II-α együtt expresszálódik a Cre rekombinázzal (CamIIα-Cre) (Casanova és mtsai., 2001). Ez utóbbi egerekben a Cre rekombináz kizárólag csak a neuronokban expresszálódik a központi idegrendszerben. Az utód generációban, a kettős mutánsokban, melyekben egyaránt előfordul LoxP-ERα és CamIIα-Cre, a rekombináz enzim a neuronokban kivágja a LoxP szekvenciák közé zárt ERα-t kódoló génszakaszt és így a neuronokban az ERα nem expresszálódik.

5. GnRH neuron specifikus CREB KO (GnRH-CREB KO), globalis CREM KO (global-CREM KO) és a GnRH-CREB KO/global-CREM KO (5)

A GnRH-CREB KO egereket az nERαKO egerekhez hasonlóan LoxP-Cre génszabászati technológiával állítottuk elő, CREB^{loxP/loxP} (Mantamadiotis és mtsai., 2002) és GnRH-Cre egerek keresztezésével, aminek eredményeképpen a GnRH neuronból kiütöttük a CREB gént. Mivel a CREM képes kompenzálni a CREB gén delécióját (Rudolph és mtsai., 1998; Mantamadiotis és mtsai., 2002) ezért global-CREM KO egereket is használtunk kísérleteinkben, melyekben valamennyi sejtből hiányzik a CREM. Így a dupla KO, GnRH-CREB KO/global-CREM KO mutáns, egerekben a CREB és a CREM gén is hiányzik a GnRH neuronokból.

6. GnRH- $ER\beta$ KO (2)

Ezekben az egerekben a GnRH neuronokból ütöttük ki az ER β -t. A GnRH-CREB KO egerekhez hasonlóan a GnRH-ER β KO egereket is LoxP-Cre génszabászati technológiával GnRH-Cre és ER β ^{loxP/loxP} állatok keresztezésével állítottuk elő.

A transzgenikus és a KO egerek szaporításához szükséges genotípus vizsgálatokat farok biopsziából nyert mintából polimeráz chain reakció (PCR) technikával végeztük.

5.1.1. A pubertás és az ösztrusz ciklus vizsgálata (3)

Az ösztrusz ciklus szakaszait (ösztrusz, proösztrusz, diösztrusz, metösztrusz) vaginális kenetekből állapítottuk meg. A CREB/CREM mutáns prepubertális nőstény egereknél minden nap megvizsgáltuk a vagina nyílását. Amikor a vagina kinyílt, attól a naptól kezdve vaginális keneteket vettünk, ameddig az ösztrusz ciklus meg nem jelent. Az első ösztrusz megjelenésétől számítva két hét elteltével, az ösztrusz ciklus szakaszainak a váltakozását figyeltük három héten keresztül a vaginális kenetek sgítségével.

5.1.2. A termékenység vizsgálata (3)

A CREB/CREM mutáns nőstény egerek termékenységét, vad típusú hím egerekkel 6-12 hónapig való párban tartás segítségével határoztuk meg. A születések időpontját, az utódok számát és a szülések között eltelt időt jegyeztük fel.

5.2. Műtéti kezelések

5.2.1. Gonadektómia (2-15)

Kísérleteink nagy részét gonadektomizált egereken végeztük, azért, hogy az endogén gonadális hormon koncentráció és a beadott E2 kölcsönhatását minimalizáljuk. Az állatokat Avertinnel (1,9% tribromoethanol és 1,2% amyl-hydrate fiziológiás sóoldatban; dózis: 0,1ml/10g) altatva, dorzális inciziót követően bilateralis ovariektómiát végeztünk és a műtét végén az izmokat és a bőrt visszazártuk. A hím állatokon Avertin anesztézia alatt orhidektómiát végeztünk. A gonadektómiát követően a következő kísérleti beavatkozásig 2-3 hét telt el.

5.2.2. Sztereotaxikus mikroinjekciók (1,5,15,16)

A SI/NBM-be adott mikroinjekciós eljárást eredetileg patkányokra dogloztuk ki (15,16), majd ezt a tudásunkat felhasználva sikeresen ültettük át egérre (1,5).

Az egerek egy részét Fluothannal (1,4%) 1 l/perc áramlási sebesség mellett altattuk és az állatok fejét egy egér adaptorral ellátott sztereotaxikus apparátusba rögzítettük (David Kopf Instruments, Tujunga, CA; Stoelting, Dublin, Ireland). 1 μl NMDA-t (1, 10, és 20 mM) Tris pufferben (TBS-ben, pH 7,6) oldva lassan (0,1 μl/perc) egy Hamilton mikroinjekciós fecskendő segítségével injektáltunk a jobb oldali SI/NBM komplexbe a következő sztereotaxis koordinátáknak megfelelően (Paxinos és Franklin, 2001): a bregmától anteroposterior irányban 0,58 mm, lateralisan 1,75 mm és dorso-ventralisan 4 és 4,5 mm a durától (0,5 μl NMDA-t adva mindkét dorso-ventralis koordinátára). A kontroll injekciókat TBS-sel végeztük.

A nem-klasszikus ösztrogén szenzitív jelátvivő rendszerek feltérképezésénél szelektív PKA gátló H-89-et, vagy 0,1 μ g/ μ l mitogen-activated protein kinase 1/2 (MEK1/2) gátló U0126-ot (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-amino-phenylthio]butadiene) alkalmaztunk ACSF 10%-os dimethylsulfoxide-os (DMSO) oldatában. Az ACSF a következő anyagokat tartalmazta mM-ban megadva: 147 Na⁺; 3,5 K⁺; 2 Ca²⁺; 1 Mg²⁺; pH 7,3. Ezeket az

inhibitorokat Fluthane (1,5%) anesztézia alatt sztereotaxikusan az oldalkamrába injektáltuk. A kontroll állatok 10% DMSO-t kaptak ACSF-ben feloldva az oldalkamrákba.

5.2.3. Ösztrogén kezelés (1-15)

Az ösztrogén kezeléseket 3,3 vagy 33 ng/g koncentrációjú E2-vel (Sigma, Poole, UK) végeztük úgy, hogy a 0,1 ml ethyl-oleatban oldott E2-t subkután injektáltuk. A genisteint 0,1 ml oleum hellianthiban oldottuk fel és 0,3, 3,3 vagy 33 ng/g dózisban subkután adtuk be az állatoknak.

5.2.4. Ösztrogén negatív visszacsatolás protokoll (3)

A CREB/CREM mutáns egereket és azok vad típusú egyedeit 10-12 hetes korban Avertinnel anesztetizáltuk majd a bilateralis ovariektómia előtt 50 μl vérmintát vettünk az állatok farkából. Hét nappal az ovariektómia után az állatokat újra elaltattuk Avertinnel és újabb farok vérmintát nyertünk. Két nappal később 33ng/g E2-t adtunk az állatoknak és három óra múlva Avertinnnel túlaltattuk az egereket majd a perfúzió előtt a jobb pitvarból vérmintát vettünk LH mérés céljából. A szérum mintákat az LH meghatározásig -20 ⁰C-on tartottuk. A korábbi vizsgálatok szerint ebben a protokollban az LH szint alacsonynak adódott a gonadálisan intakt egerekben, emelkedettnek mutatkozott az ovariektómiát követően és szingnifikánsan csökkent a koncentrációja három órával az E2 adása után (Chan és mtsai., 2011).

5.2.5.Szövettani perfúzió (2-16)

Az in vivo immunhisztokémiai és hisztokémiai vizsgálatokhoz az állatokat túldozírozott Avertinnel elaltattuk, majd 15 ml 7,6 pH-jú jéghideg 4%-os paraformaldehidet (PFA) tartalmazó foszfát pufferrel transzkardiálisan perfundáltuk. Az állatok egy részénél a perfúzió előtt a jobb pitvarból vérmintát vettünk és a plazmát -20 °C-on lefagyasztva tartottuk az E2 mérésig. A perfúzió után az agyakat eltávolítottuk és két óráig 4%-os PFA-ban poszt-fixáltuk, majd ezt követően TBS 30%-os szukróz oldatába helyeztük, 24 órára 4 ⁰C-on. A fixált agyakból a következő nap 30μm vastag szeleteket készítettünk fagyasztó mikrotóm segítségével.

5.3. Immunhisztokémia (2-15)

A fénymikroszkópos vizsgálataink egy részében immunperoxidáz hisztokémiát alkalmaztunk, ahol az agyszeleteket a TBS-ben történő mosás után az endogén peroxidáz

aktivitás csökkentése miatt 0,1% H₂O₂-ot és 40% metanolt tartalmazó TBS-ben előkezeltük. Ezt követően az agyszeleteket a primer antitestekkel (CREB (1:1000), pCREB (1:200), ERK1/2 (1:1000), pERK1/2 (1:1000), Cell Signaling Technology; ChAT (1:2000), Chemicon, Temecula; LR1 (1:10000), sheepGnRH (1:1000)) inkubáltuk 24 órán át. Ezután a biotinnel megjelölt fajspecifikus másodlagos antitestekkel, majd avidin peroxidáz-komplexszel (ABC Elite kit, Vector) inkubáltuk a szeleteket. A peroxidáz reakciót és az antitest kapcsolódási pontok láthatóvá tételét nikkel-diaminobenzidin tetrahydrokloridot (Ni-DAB) és glükóz oxidázt tartalmazó hívóoldattal végeztük.

A kettős jelöléses immunperoxidáz alapú vizsgálatainkat olyan esetekben végeztük, ahol ugyanabban a sejtben lévő citoplmazmatikus antigén (pl. ChAT vagy GnRH) egy másik a magban expresszálódó antigénnel (pl. CREB) együtt került kimutatásra. A kolinerg neuronok sejttestét ChAT ellen termelt antitest segítségével mutattuk ki (1:2000; Chemicon, Temecula). Ezekben a vizsgálatokban a CREB-et és a pCREB-et (133-as szerinen foszforilált CREB) Ni-DAB-bal, a GnRH-t ill. a ChAT-ot DAB-bal hívtuk elő.

Fluorescens fénymikroszkópiás vizsgálatokat akkor alkalmaztunk, amikor a kimutatandó antigének citoplazmatikus lokalizációt (ERK1/2 és pERK1/2 a GnRH neuronban, ERα a ChAT pozitív neuronban) mutattak illetve a neuronok morfológiai tulajdonságait kvantitatív elemzésnek vetettük alá (pl. GnRH dendrit számának meghatározása). Ezekhez a vizsgálatokhoz különböző fajokból termelt primer antitesteket választottunk. A jelölésekben a másodlagos antitestek egy része fluorofort tartalmazott a másik részük biotinilálva volt, amihez streptavidin-kapcsolt fluorofort illesztettünk. Ilyen módon a GnRH neuronokat zöld színű Alexa-488-al, a citoplazmatikus lokalizációval rendelkező jelátviteli molekulákat (ERK1/2, pERK1/2) piros Cy5-el jelöltük. Az ERα fluorescens immunhisztokémiai (MC-20-as antitest, 1:250; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)) eljárás jelentős részét lymfocitákon dolgoztuk ki majd adaptáltuk szövettani metszeteinkre (6).

5.4. Hisztokémia (1,4,5)

A SI/NBM-ben lévő kolinerg neuronok projekciós rostjait ezüst intenzifikációval kiegészített AChE hisztokémiai eljárásunk segítségével először patkányban mutattuk ki (15,16) majd ezt felhasználva adaptáltuk az eljárást egérre (1,4,5). Az immunhisztokémiai eljárásokhoz hasonlóan perfundáltuk az állatokat, majd 30 µm vastag metszeteket készítettünk az agyakból. Az agyszeleteket nátrium citrátot (0,1 M), rézszulfátot (0,03 M), káliumferricianidot (5 mM) és Ach-jodidot (25 mg/50 ml) tartalmazó nátrium acetátban

inkubáltuk (0,1 M; pH 6). Ezután a szeleteket ammónium szulfid (1%) és ezüst nitrát (1%) keverékébe helyeztük 1 percre, hogy láthatóvá tegyük az AChE-tartalmú neuronokat és azok rostjait.

5.5. Szövettani képanalízis

5.5.1. ERK1/2 és CREB expresszió meghatározása központi idegrendszerben (7, 12,13,14)

A peroxidáz immunhisztokémia után az immunreakció mértékét kvantitatív immunhisztokémiával határoztuk meg. Ezekben a vizsgálatokban számítógépes képanalizáló rendszereket használtunk, (BX51 Olympus mikroszkóp F-view CCD kamera, AnalySIS képalkotó program (Soft Imaging System GmbH, Németország)). A metszetek analízisét 20-

szoros nagyításon, vakon végeztük, hogy az analízis alatt ne tudjuk, melyik állat milven kezelést kapott. Hét agyi régiót választottunk ki a kvantitatív analízishez az előzetes kvalitatív vizsgálat és az ösztrogén receptor expresszió alapján: medialis preopticus mag (MPN),



8. ábra A kvantitatív méréseinkben figyelembe vett néhány anatómiai terület nagysága. A négyszögek méretarányosan mutatják azokat a terület arányokat, ahol az adott anatómiai területen (itt MPN, vIVMN, MS és CA1) a CREB és a pCREB immunreaktív sejtek számolása történt. A koronális metszet sémák a Paxinos és Franklin egér agy atlasz (2001) alapján készültek. A számok az atlasz sematikus metszeteinek sorszámait mutatják.

medialis septum (MS), antero-ventralis periventricularis mag (AVPV), cingularis cortex (gCTX), hippocampus CA1-es területe, ventro-medialis mag ventro-laterális része (vlVMN) és a caudatum-putamen. Az adott anatómiai régióhoz tartozó vizsgált terület nagysága állandó volt (8. ábra). Az ERK immunhisztokémia esetében a citoplazmatikus festődést mutató sejtek nagy számú átfedése miatt optikai denzitást mértünk. Minden állat esetében 2-2 azonos síkban lévő metszetet elemeztünk, kijelölt anatómia területenként. Ezeket átlagoltuk, és a továbbiakban ezzel jellemeztük az adott állatot.

5.5.2. ERK1/2 és CREB expresszió kvantifikálása a GnRH neuronban (2,12,14)

Ezekben a vizsgálatokban az immunhisztokémiával megjelölt jelátvivő molekulák, ERK1/2, pERK1/2, CREB, pCREB kifejeződését mértük a GnRH neuronokban. A méréseket a fenti vizsgálatokhoz hasonlóan vakon a kísérleti csoportokhoz tartozó tárgylemezek

előzetes ismerete nélkül végeztük. Az analízis során meghatároztuk a GnRH neuronok számát és azoknak a GnRH neuronoknak az arányát, melyek kettős jelöléssel rendelkeztek az adott jelátvivő molekulára nézve. Az MS-ben, az rPOA-ban és az AHA-ban megtalálható GnRH neuronokat vizsgáltuk (9. ábra). Az adott anatómiai régióhoz tartozó vizsgált terület nagysága állandó volt. A kettős jelöléses peroxidáz immunhisztokémiai vizsgálatot Olympus BX51 mikroszkóp (Olympus Corporation, Shinjuku-ku, Tokyo, Japán) segítségével végeztük. Kritériumaink szerint a barna színű citoplazmatikus festődést mutató GnRH neuront akkor tartottuk CREB illetve pCREB antitestek által jelöltnek, ha a magban egy körülhatárolt fekete precipitátumot (CREB, pCREB) tartalmazott.

A fluorescens metszetek vizsgálata konfokális lézer szkenning mikroszkóppal

(KLSM, Olympus FV500, Zeiss LSM 510) történt. Az Alexa 488 fluorescens festéket 488 nm hullámhosszú Argon lézerrel (zöld lézer), míg a Cy5 fluorescens jelölőanyag gerjesztését 649 nm excitációs hullámhosszú Helium Neon lézerrel (piros lézer) végeztük. Az optikai rétegvastagságot a megfelelő hullámhossz tartományhoz hangolt konfokális appertura



9. ábra A kvantitatív méréseinkben figyelembe vett területek GnRH neuron reprezentációja. A Paxinos és Franklin egér agy atlaszból (1997) vett sematikus diagrammok és a fluorescens GnRH immunhisztokémiai mikrofotók mutatják azokat a területeket (MS, rPOA és AHA) ahol a mérések történtek. A számok az atlasz sematikus metszeteinek sorszámát mutatják. A kék színű korongok érzékeltetik a GnRH neuronok eloszlását az egér agyban a kijelölt területeken. Kalibrációs szakasz = 100 µm.

méretének változtatásával 8 µm-re állítottuk be. Az analízist minden állatnál anatómiai területenként két-két metszeten végeztük és az adott területhez tartozó értékeket átlagoltuk. Ezek az adatok szolgáltatták a csoportátlagot (± átlag szórása, SEM). A kettős jelölésű GnRH neuronok számát az adott állat, adott neuroanatómiai területén lévő összes GnRH neuron számának százalékában határoztuk meg.

5.5.3. GnRH neuron somaticus tüske analízis (3)

Ezekben a vizsgálatokban a GnRH neuron morfológiai tulajdonságait elemeztük fluorescensen jelölt (Alexa-488) GnRH neuronokon. A GnRH neuronokat az rPOA-ban detektáltuk KLSM segítségével. A felvételek 400 nm-es optikai metszetvastagsággal készültek. A GnRH neuronok somáján azokat a citoplazmatikus nyúlványokat azonosítottuk

tüskéknek, amelyek végpontja a sejt felszínétől számítva 1-5µm tartományban helyezkedett el. A tüskedenzitásokat minden felvételen megszámoltuk és a sejtek kerületét is meghatároztuk minden egyes GnRH neuron esetében.

5.5.4. CREB-ChAT kettős jelölés analízise (10)

Az immunperoxidáz immunhisztokémiával jelölt ChAT pozitív neuronokban a CREB és a pCREB expresszió mértékét Olympus BX51 mikroszkóp (Olympus Corporation, Shinjukuku, Tokyo, Japán) segítségével vizsgáltuk meg. A kolinerg neuronokat három területen analizáltuk: MS, SI/NBM és caudatum-putamen. A kettősen jelöl ChAT neuronok számát az adott állat, adott neuroanatómiai területén lévő öszes ChAT neuron számának százalékában határoztuk meg.

5.5.5. ChAT immunpozitív neuronok meghatározása az SI/NBM-ben és az AChE tartalmú rostok analízise az agykéregben NMDA adását követően (1,5,14,15)

Ezt az eljárást is patkányban dolgoztuk ki (14, 15), majd sikeresen adaptáltuk egérre (1,5). Olympus BX51 mikroszkóp segítségével 20-szoros nagyításnál számoltuk meg az immunperoxidáz hisztokémiával jelölt ChAT neuronokat az SI/NBM-ben a léziós és a kontroll oldalon. Állatonként hat metszeten végeztük az analízist és a sejtveszteséget a kontroll oldal százalékában adtuk meg, majd az adatokat átlagoltuk.

Az SI/NBM komplexből projiciáló kolinerg rostok területi denzitásait a szomatoszenzoros kéreg V. és IV. rétegében, az ipsilaterális és a kontralaterális szomatoszenzoros cortexben mértük, kvantitatív automatizált képanalízis, Olympus BX51 mikroszkóp, F-View II camera (Olympus, Tokyo, Japán) és Cell-P Image Analysis software (Olympus, Melbourne, Ausztrália) segítségével. Mivel az NBM-nek a projekciója unilaterális, a kontralaterális oldal kontrollként szolgált minden egérnél és az injektált oldal rost redukcióját a kontroll oldal százalékában fejeztük ki. Minden állatból 12 metszetet vettünk és a mérés eredményeit állatonként átlagoltuk.

5.6. E2 és LH radio-immuno-assay (RIA) (4,5,10,14)

Azért, hogy a beadott E2 hatására megnövekedett vér-E2 koncentráció változását pontosan nyomon kövessük valamint az LH szintre gyakorolt negatív visszacsatolást meghatározzuk a vérplazma E2 és LH koncentrációját RIA-val határoztuk meg. Ezekben a vizsgálatokban az immunhisztokémiai illetve a hisztokémiai vizsgálatoknál történt perfuzió előtt a szívből vettük a vérmintát és a vérplazmát lefagyasztottuk a RIA mérésig. A plazma E2

koncentrációját egy harmadik generációs ösztradiol kit (DSL-39100; Diagnostic System Laboratories, Dallas, TX) segítségével határoztuk meg. A detekciós küszöb 0,6 pg/ml, az interassay variációs koefficiens 4,1% volt. A palzma LH értékeket anti-rLH-S-11 ellenanyag és egér LH referencia preparátum segítségével határoztuk meg (National Hormone and Peptide Program, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

5.7. Western blot analízis (7)

Ezekben a mérésekben a genistein hatásait vizsgáltuk a pCREB és a CREB expresszióra a patkány hypothalamusban. Az E2 illetve a genistein kezelést követően túldozírozott anesztéziában (ketamine 50 mg / kg, xylazine 10 mg / kg, pipolphen 5 mg / kg; i.p.) dekapituláltuk az állatokat és a hypothalamust mikrodisszekáltuk. A mintákat előkészítettük futtatáshoz, majd 9%-os SDS polyacrylamide gélen futtattuk és nitrocellulóz membránra transzferáltuk őket. A proteinek kimutatásához pCREB és CREB antitesteket használtunk (1: 1000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). A gélen lévő protein mennyiség verifikálására actin ellen termelt antitestet alkalmaztunk (1: 5000; Abcam, Cambridge, UK). Avidin-biotin immunperoxidázt és Enhanced chemiluminescence-t (ECL) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) használtunk az antitestekhez kapcsolt proteinek kimutatására. A kapott termékeket Amersham LabScan densitométerrel és Phoretix2D (Amersham, Germany) programmal analizáltuk.

5.8. In vitro egy-sejt elektrofiziológia (9)

Ezekben a mérésekben az E2 GnRH neuronra gyakorolt elektrofiziológiai hatásait vizsgáltuk meg. A GnRH-GFP egér agyát Avertin túldozírozása mellett gyorsan eltávolítottuk majd, jéghideg ACSF-be tettük, aminek az összetevői mM-ban: 118 NaCl; 3 KCl; 0,5 CaCl₂; 6 MgCl₂; 5 HEPES; 25 NaHCO₃; 11 d-glükóz (pH 7,3). Ezt az oldatot 95%-os O₂ és 5%-os CO₂ (karbogén) gázelegyével telítettük. Vibratom segítségével 150 µm vastag koronális túlélő agyszeleteket készítettünk, majd 28 ⁰C-on karbogénnel való telítés mellett egy másik ACSF oldatba helyeztük, amelynek az összetétele mM-ban a következő volt: 118 NaCl; 3 KCl; 2,5 CaCl₂; 1,2 MgCl₂; 5 HEPES; 25 NaHCO₃; 11 d-glükóz (pH 7,3). A mérést egy fluoescens Olympus BX51 elekrofiziológiai mérésekre átalakított mikroszkóppal, az arra helyezett inkubációs kamrában végeztük a karbogénnel telített ACSF oldat folyamatos áramlása mellett (1–2 ml/perc).

Whole cell patch-clamp alkalmazásával áramokat vezettünk el a GnRH-GFP neuronokról szobahőmérsékleten a GFP szignál láthatóvá tétele után. Az open resistance 4–

8mΩ közé esett, míg a seal resistance 1–3GΩ volt. Az áram regisztrálásához használt üvegelektródok a következő vegyületeket tartalmazták (mM-ban): 140 KCl; 20 HEPES; 0,5 CaCl₂; 5 EGTA; 5 MgATP (pH 7,2). A GnRH neuronok elektromos aktivitását headstage (CV-7B)-hez kapcsolt Multiclamp 700A erősítővel (Molecular Devices) regisztráltuk. Az áramjeleket 1 kHz-el szűrtük és 10 kHz-en digitalizáltuk analog-digital converter (Digidata1322A) és pClamp (Version 10.1; Molecular Devices) szoftver segítségével. A sejtmembrán kilyukasztása után a GnRH neuron membránjának feszültségét 70 mV-on "clampeltük" és stabilizáltuk 5 perccel azelőtt, hogy olyan oxigenizált ACSF-re váltottunk volna (2–3 ml/min áramlási sebesség mellett) ami 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-diont (CNQX), DL-2-amino-5-phosphonovaleric savat (AP-5), és tetrodotoxint (TTX) tartalamazott. Az kísérleti protokoll a követező volt: 15 perces előkezelés, amit 15 perces 100 nM-os E2 vagy ACSF-es kezelés követett, és végül a 15 perces kimosási periódus következett. A miniatür posztszinaptikus gátló áramok (mIPSCs) amplitúdójának és frekvenciájának mérését Mini Analysis programmal (Version 6.0; Synaptosoft Inc.) végeztük.

5.9. Túlélő agyszelet készítése a CREB és az ERK1/2 foszforiláció in vitro vizsgálataihoz (2,10,14)

Ezekben a vizsgálatokban az E2-nek a GnRH neuron jelátviteli rendszerére gyakorolt in vitro hatásait teszteltük. Az agyszeleteket az elektrofiziológiai méréseknél a fent részletezett procedura alapján készítettük elő. Az agyszeletek 400 µm vastagságúak voltak és az elektrofiziológiai mérésekhez hasonlóan oxigenizált ACSF-ben inkubáltuk őket. Az agyszeleteket E2-vel (100 nM, 100 pM), membrán impermeábilis E2-vel, E2-BSA-val (100 pM) vagy a vivőanyaggal (ethanol, <0,01%) kezeltük. A jelátvivő molekulákat a következő anyagokkal blokkoltuk: a PKA-t H-89-cel, a MEK-et U0126-tal, a CaMKII-t autocamtid-2related inhibitory peptiddel (AIP) és a protein kináz C-t (PKC) bisindolylmaleimid I hydrochloriddal (GF109203X). Az akciós potenciál dependens szinaptikus neurotranszmissziót és a y-amino vajsav (GABA)/glutamát receptorokat egy "inhibitor kotellal" blokkoltuk, melyben a következő vegyületek voltak: TTX, picrotoxin, CNQX és AP5. Az E2–BSA oldatból a kísérlet megkezdése előtt közvetlenül filtrációval távolítottuk el a szabad E2-t, a korábbi kísérletekben leírtak szerint (Stevis et al., 1999). A kezelések végeztével az agyszeleteket 4%-os PFA-ban fixáltuk 4°C-on 24 órán keresztül. A következő napon 3,3%-os szukrózt tartalmazó TBS-be tettük őket 3 órára, majd 30µm-vastag koronális metszeteket készítettünk belőlük pCREB/CREB és pERK1/2/ERK1/2 immunhisztokémiai vizsgálatokhoz.

dc 474 12

5.10. Ca²⁺ imaging és adat analízis (9)

Képalkotó Ca²⁺ eljárásokkal mértük a Ca²⁺ szint változásait a GnRH neuronokban. Ezekhez a mérésekhez GnRH-pericam egereket használtunk, melyekben raciometrikus pericam molekula expresszálódik a GnRH neuronokban. A raciometrikus pericam molekula egy cirkuláris sárga fluorescens proteinből ((Cp)YFP), a Ca^{2+} kötő proteinből, kalmodulinból (CaM), és a harántcsikolt izom könnyű lánc kinázának CaM kötő régiójából áll (m13) (Nagai és mtsai.,



10. ábra Raciometrikus pericam molekula konformáció és a fluorescencia paraméterinek megváltozása Ca^{2+} kapcsolódás esetén. Egy pericam molekulához 4 Ca^{2+} ion kapcsolódhat. A pericam molekulának Ca^{2+} koncentrációtól függő egy emissziós maximumhoz (512 nm) tartozó két excitációs maximuma (415nm, 493 nm) van. (Cp)YFP: cirkuláris sárga fluorescens protein, CaM: kalmodulin, m13: harántcsikolt izom könnyű lánc kinázának CaM kötő régiója.

2001). A raciometrikus pericam molekula Ca^{2+} koncentráció függő módon változtatja a konformációját és az excitációs hullámhossz tartományát. Ca^{2+} hiányában, amikor az m13 és a CaM nem kötődik egymáshoz a pericam molekula 512 nm-en mért emissziója eléri a maxiumumát, ha 415 nm-es hullámhosszúságú fénnyel gerjesztjük. Amikor Ca^{2+} jelenlétében az m13 kapcsolódik a CaM-mal, az 512nm-en mért emissziós maximuma 493nm hullámhosszúságú fény alkalmazásánál jelentkezik. Az így kapott két emissziós érték hányadosa (ratio 493/415) arányos a GnRH neuron Ca^{2+} szintjével. A pericam molekula GnRH neuront célzó expressziója tehát lehetővé teszi, hogy a sejtek vastagságából, vagy az indikátorfesték sejt penetrációs tulajdonságaiból származó műtermékektől megszabadulva, precízen tudjuk mérni az intracelluláris Ca^{2+} szint változásait a GnRH neuronokban.

Vizsgálatainkban a GnRH-pericam állatok agyából az elektrofiziológiai mérésekhez hasonló módon túlélő agyszeleteket készítettünk és a mikroszkóp (BX51, Olympus (Tokyo, Japán)) inkubációs kamrájába helyeztük. A pericam molekula gerjesztését alternáló 493 nmes és 415 nm-es hullámhosszúságú fénnyel végeztük és az emittált fotonokat egy 525nm–es szűrővel szelektáltuk egy gyors fény-hullámhossz váltó segítségével (Sutter Instrument, Lambda DG-4 high-speed filter (Sutter Instrument Co., Novato, CA)). A felvételeket másodpercenként készítettük egy ORCA-ER CCD kamerával (Hamamatsu Corp., Hamamatsu City, Shizuoka, Japán) és a MetaFluor (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) szoftver segítségével. A GnRH-pericam sejteken (háttér és sejt test) a fluorescens intenzitás adatait saját készítésű program segítségével analizáltuk. A Ca²⁺ tranzienseket és az alapvonal

változásait Daubechies 4 wavelet transzformációval detektáltuk. A Ca²⁺ tranzienseket akkor vettük figyelembe, ha az amplitudója nagyobb volt, mint az alapvonal 10%-a. A kísérleti protokoll (a vegyszerek alkalmazásának a módja) ugyanaz volt, mint az elektrofiziológiai vizsgálatoknál.

5.11. Egy-molekula detekciós mikroszkópia (17)

Egy-molekula detekciós mikroszkópiával vizsgáltuk az E2-nek a TrkA receptorra gyakorolt nem-klasszikus hatásait (Koszegi, 2011). Ezekben a kísérletekben a ChAT-GFP egerek agyából az elektrofiziológiai mérésekhez hasonlóan túlélő agyszeleteket készítettünk és abból enzim mentes mechanikus sejt disszociáció segítségével az SI/NBM-ből ChAT-GFP neuronokat disszociáltunk. A disszociációhoz vibratomot használtunk, melybe egy erre a célra kiképzett üvegpipettát fogtunk be, amit a túlélő agyszelet felszínén 30-60 Hz frekvenciával 0,2-2mm amplitúdóval 2-5 percig mozgattunk. A felszabadított sejteket polilizinnel bevont fedőlemezekre helyeztük. Ezzel a módszerrel kb. 15-25 ChAT-GFP sejtet azonosítottunk tárgylemezenként.

Az élő neuronon lévő TrkA receptorokat primer TrkA antitestekkel jelöltük meg (1:1000, Alomone lab), melyek a TrkA receptor molekulákon extracellulárisan lévő C-terminális részt jelölik meg. Ezt követően Quantum dot-al (Qdot) jelölt fragment F (ab')₂ másodlagos antitesttel (1:800, Invitrogen) inkubáltuk a sejteket. A Qdot egy félvezető nano-

gömb, mely rendkívül fotostabil és tízezerszer fényesebb, mint az organikus fluoroforok (). A Qdot jellegzetességei közé tartozik, hogy fluorescenciájának

intenzitása intermittálóvá válik, amennyiben egydül áll. A jelölés után az idegsejteket tartalmazó tárgylemezt a mikroszkóp diffúziós kamrájába tettük, ahol a következő kezelési



11. ábra A ChAT-GFP neuron membránjában lévő Qdot-al jelölt TrkA receptor molekulák kimutatása teljes belső visszaverődéses fluorescencián alapuló mikroszkópiával (TIRFM-val). A TIRFM-nál a beeső lézerfény nagyobb beeséséi szöggel érkezik a magas diffrakciós indexxel rendelkező törőközegből (fedőlemez) az alacsonyabb (sejtmembrán és vizes fázis) felé, mint a teljes belső visszaverődéshez szükséges kritikus szög (θ). A visszaverődési határon egy eletromágneses ún. evaneszcens mező keletkezik az alacsonyabb diffrakciós indexel rendelkező közegben, jelen esetben a kolinerg neuron membránjában. Ez a mező a membránban lévő TrkA receptorokhoz kötött Qdot-okat gerjeszti. A evaneszcens mező energiája a sejtmembrán felszínétől mérve exponenciálisan csökken, áthatoló mélysége 50-100 nm.
protokollt alkalmaztuk: 2 perc előkezelés ACSF-fel, amit 2 perc 100 pM E2-vel vagy 100 nM NGF-el való kezelés követett.

Az egy-molekula detekcióra objektív lencse alapú saját célra gyártott teljes belső visszaverődéses fluorescencián alapuló mikroszkópot (Total Internal Reflection Fluorescence Microscope-ot ((TIRFM-ot), Olympus) használtunk. Ebben a mikroszkópban az objektíven keresztül a kritikus szögben érkező lézerfény teljesen visszaverődik a fedőlemez-idegsejt határvonalon. Ezen a törőfelszínen létrejövő beeső "evaneszcens" (tovatűnő) mezőnek nevezett, nagyon kis rétegvastagságban (50-100 nm) penetráló elektromágneses hullámok gerjesztik a membránban lévő Qdot molekulákat, melyek ez által egy igen szűk hullámhossz tartományban, jelen esetben 655±5 nm-en bocsátanak ki fotonokat (11. ábra). A fotonok detektálására 100-szoros nagyítású TIRFM objektívet és egy elektronsokszorozós CCD kamerát (Hamamatsu Photonics, 9100-13) valamint a Metamorph Premiere szoftvert (Molecular Devices) használtuk. A ChAT-GFP neuronokat mercuri lámpával és GFP filter kocka (Olympus) segítségével azonosítottuk. A Qdot655-öt 401 nm-es lézerfényt kibocsátó diódalézerrel gerjesztettük. A Qdot655 fluorescenciáról a felvételeket 33 ms-ként készítettük.

Az Qdot-tal jelzett TrkA molekulák trajektóriáit a saját szoftverünkkel határoztuk meg (Matlab, Mathworks). A trajektóriák mobil és immobil szegmenseinek meghatározásához Simson és Sheets módszerét követtük (Simson és mtsai., 1995) és kiszámoltuk az immobil szakaszok valószínűségét (P). Ezen felül a mean square displacement-et (MSD) (Kusumi és mtsai., 1993) és a diffúziós koefficienst (D) határoztuk meg az MSD kezdeti szakaszából lineáris regresszióval (MSD = 4Dt, ahol t a diffúzió ideje). A paraméterek meghatározásához minimálisan 100 molekula trajektóriáját használtuk kezelésenként.

5.12. Statisztika

Az eredményeket az átlag \pm átlag szórása (\pm SEM) feltüntetésével ábrázoltuk. A szignifikancia meghatározásához a STATISTICA 7.0 programot (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) használtuk. A kísérleti csoportok közötti különbségek meghatározására a kísérleti elrendezésnek megfelelően egy vagy két utas ANOVA-t, Mann-Whitney U illetve Wilcoxon tesztet alkalmaztunk. A szignifikancia határa p <0,05-nél volt, és ezt az adott diagram megfelelő oszlopában csillaggal ábrázoltuk.

6. Eredmények és következtetések

6.1.Az ösztrogének gyors hatása a CREB és az ERK1/2 foszforilációra a központi idegrendszerben in vivo (7, 11, 12, 13)

Első kísérletsorozatunkban arra kerestük a választ, hogy az E2 egyszeri injekciója mely területeken okoz gyors nem-klasszikus hatásokat a CREB és az ERK1/2 foszforilációban hím és nőstény egerek központi idegrendszerében. Ezekben a kísérletekben a jelenségek klasszikus ösztrogén receptoroktól való függőségét is meghatároztuk. Megvizsgáltuk továbbá azt is, hogy a jól ismert fitoösztrogén, a genistein rendelkezik-e E2-szerű nem-klasszikus hatásokkal a neonatális központi idegrendszerben.



12. ábra E2 indukálta CREB foszforiláció dózis és idő függése az agy különböző területein. A grafikonok az átlag értékeket mutatják (+SEM) a vivőanyag (V) hatásának %-ában mérve. Régiónként feltüntettük a 33ng/g E2 hatását a CREB foszforilációra az E2 adásától számítva 15 perc, 1óra és 4 óra múlva. Ezen kívül régiónként ábrázoltuk a 3,3 és a 33 ng/g E2 hatását a pCREB expresszióra (*p<0,05). Terület rövidítések: lásd szöveg.

6.1.1 Eredmények

6.1.1.1 Az E2 hatása a CREB és az ERK1/2 foszforilációjára a központi idegrendszerben

Ezekben a vizsgálatokban a CREB foszforiláció mértékét az E2 adása után 15 perccel, 1 órával és 4 órával határoztuk meg az ovariektomizált nőstény egerek központi idegrendszerében. Az immunperoxidáz hisztokémiai festések megmutatták, hogy a pCREB és a CREB immunreaktivitás a sejtmagra lokalizálódik. Az E2 adása szignifikánsan emelte a pCREB-et expresszáló sejtek számát az MPN-ben, az MS-ben, a hippocampus CA1 régiójában, az AVPV-ben és a vlVMN-ben (12. ábra). Ezzel szemben az E2 hatástalannak bizonyult a gCTX-ben és a caudatum-putamen területén (12. ábra). Ez a változás az MPN-ben, MS-ben, CA1-ben, AVPV-ben 15 percen belül jelentkezett és 4 órán keresztül fennmaradt (12. ábra). A vlVMN-ben a pCREB expresszió emelkedés 1 óra múlva kezdődött és még 4 óránál is szignifikánsan magas volt (12. ábra). A 3,3ng/g és a 33ng/g E2 hasonló hatást produkált a pCREB expresszióra valamennyi vizsgált területen (12. ábra). A CREB immunreaktív sejtek száma E2 hatására nem változott egyik vizsgált területen sem.

A CREB foszforiláció szabályozásában az ERK1/2 alapvető szerepet játszik

(Shaywitz és Greenberg, 1999). Ezért a következő kísérletben meghatároztuk az E2 hatását az ERK1/2 és a pERK1/2 expresszióra. Az immunperoxidáz hisztokémiai vizsgálataink megmutatták, hogy az ERK1/2 immunreaktivitás a citoplazmában és az idegrostokban mutatható ki, míg a pERK1/2expresszió ezeken kívül a sejtmagban is megfigyelhető. Erős ERK1/2és pERK1/2 immunreakciót találtunk a hypothalamus preoptikus területén, a hypothalamus paraventricularis és supraopticus magjában valamint a bed nucleus of terminalisban. stria Gyengébb volt a festődés a piriform cortexben, a centralis amygdalában, a



13. ábra E2 indukálta ERK1/2 foszforiláció dózis és idő függése az agy különböző területein. A grafikonok az átlag értékeket mutatják (+SEM) a vivőanyag (V) hatásának %-ában. Régiónként feltüntettük a 33 ng/g E2 hatását az ERK1/2 foszforilációra az E2 adásától számítva 15 perc, 1óra és 4 óra múlva. Ezen kívül régiónként ábrázoltuk a 3,3 és a 33 ng/g E2 hatását a pERK1/2 expresszióra (*p<0,05). Terület rövidítések: lásd szöveg.

thalamusban és a gCTX-ben. Kvantitatív képanalízis segítségével megvizsgálva a CREB immunhisztokémiánál figyelembe vett területeket, az MPN-t és a gCTX-et, azt találtuk, hogy az E2 alkalmazása 15 percen belül dózisfüggő módon két és félszeresére emelte a pERK1/2 expressziót az MPN-ben de a gCTX-ben ez nem volt hatásos (13. ábra).

6.1.1.2 A klasszikus ösztrogén receptorok szerepe az E2 gyors nem-klasszikus hatásaiban a központi idegrendszerben



ábra. Az E2 indukálta CREB 14. foszforiláció klasszikus ösztrogén а receptoroktól függ. A mikrofotók a pCREB immunoreaktivitást mutatják vad típusú, ERaKO, és ERa/ER β KO E2 kezelt OVX egerekben. Az E2 növeli a CREB foszforilációt a vad típusú (VT), ERaKO, ERβKO (itt nem mutatott) és ERα/ERβ KO egerekben. Kalibrációs egyenes: 100µm, 3v: III.agykamra

A következő kísérletben azt vizsgáltuk meg, hogy az E2 ERK1/2-re és CREB-re gyakorolt gyors nem-klasszikus hatásaiban a klasszikus ösztrogén receptorok milyen szerepet játszanak. Ezeket a kísérleteket ösztrogén receptor hiányos ERaKO vagy ERBKO egereken végeztük és az ERK1/2, a pERK1/2, a CREB és a pCREB expresszió mértékét az E2 beadás után 1 órával vizsgáltuk immunperoxidáz hisztokémiával. Megállapítottuk, hogy az E2 kezelés a KO állatok vad típusú utódaiban hasonló változásokat produkált a pCREB expresszióban, mint a C57BL/6-os egereken (15. ábra). Az MPN-ben az E2 kezelés hasonló változásokat okozott a vad típusú kontroll, az ERaKO és az ERβKO egerekben (14.,15. ábra). A vad típusú és az ERaKO egereknél az MS-ben tapasztalt E2 indukálta CREB foszforiláció az ERβKO egerekben hiányzott (15. ábra). Ezzel szemben a vad típusú és az ERβKO

egereknél a vIVMN-ben az E2 emelte a pCREB immunreaktív sejtek mennyiségét, de az ER α KO állatokban nem (15. ábra). Az E2 vivőanyagával történő kezelést követően az alapszintű CREB foszforiláció az ER α KO egerek esetén a vIVMN-ben emelkedett volt a vad típusú egerek adataihoz képest (15. ábra). Az az eredmény, hogy az MPN-ben az E2-indukálta CREB foszforiláció nem függ a klasszikus ösztrogén receptoroktól, arra utalhat, hogy az ER α és ER β receptorok kompenzálhatják egymás hiányát. Ez a megfigyelés arra sarkallt, hogy kísérleteinket elvégezzük kettős KO, ER α /ER β KO, egereken, amelyekben mind az ER α , mind az ER β gén hiányzik a sejtekből. A kísérletek megmutatatták, hogy az E2 nem volt hatással a CREB foszforilációra az ER α /ER β KO egereknél az MPN-ben (14, 15.

ábra). Ezekkel az adatokkal összhangban az E2 kezelés a többi területen (vlVMN, MS, AVPV, hippocampus CA1-es régiója) sem befolyásolta a pCREB expressziót az ER α /ER β KO egerekben. A CREB alapaszintje nem különbözött az ER α KO, ER β KO és ER α /ER β KO egerekben és az E2 alakalmazása után sem mutatott változást.

A pERK1/2 expresszió vizsgálatánál megfigyelhető volt, hogy a pERK1/2 immunreaktív sejtek száma csökkent értéket mutatott a vivőanyaggal kezelt ERβKO állatokban a vad típusú testvéreik értékeihez képest az MPN-ben (16.D ábra,) . A CREB foszforiláció vizsgálatánál kapottakkal ellentétben, egyik KO egértörzsben (ERαKO, ERβKO



15. ábra. Az E2 indukálta CREB foszforiláció függ az ER α -tól, az ER β -tól vagy mindkét receptortól az agyban in vivo. Régiónként feltüntettük a 33ng/g E2 vagy a vivőanyag hatását a CREB foszforilációra az E2 adásától számítva lóra múlva ER α vagy ER β KO egerekben. Ezen kívül régiónként ábrázoltuk a 33 ng/g E2 hatását a pCREB expresszióra dupla KO (ER α /ER β KO) egerekben (+*p<0,05). Terület rövidítések: lásd szöveg.

és ER α /EK β KO) sem figyeltünk meg E2 indukálta pERK1/2 foszforilációt egyik anatómia területen sem (16. A-E ábra)



16. *ábra.* Az E2 indukálta ERK1/2 foszforiláció függ mindkét ösztrogén receptortól az agyban in vivo. A nagy és kis nagyítású kép mutatja a pERK1/2 eloszlását az MPN-ben vad típusú egér (A), ERaKO egér (B) és ER β KO (C) egér kezelését követő 15 percen belül. Kalibrációs egyenes 100 µm. A grafikonok az E2 hatását mutatják az ERK1/2 foszforilációra ERa és ER β KO egerekben az MPN-ben (D) és a gCTX-ben (E). Egy külön adatsor mutatja az E2 hatását dupla KO (ERa/ER β KO) egerekben (*p<0,05). Terület rövidítések: lásd szöveg.



6.1.1.3. Nemi különbségek az E2 nem-klasszikus hatásaiban

Korábbi kísérleteink megmutatták, hogy az E2 központi idegrendszeri hatása nagy mértékű szexdimorfizmust mutat, aminek a molekuláris háttere nem tisztázott. A következő kérdésünk

nemi különbség az E2 CREB-re ERK1/2-re és nem-klasszikus gyakorolt gyors hatásaiban. Ezekben a vizsgálatokban, előző az kísérletekhez hasonlóan, a gonadektómizált állatokon 1 órával az E2 beadása után végeztünk

tehát az volt, hogy létezik-e

immunhisztokémiát, amely időpontról előzőleg bizonyítottuk, hogy az E2 indukálta CREB



17. *ábra*. Az E2 hatása a CREB foszforilációra hím és nőstény agyban. A grafikonok az E2 hatását mutaják a CREB (A) és pCREB (B) expresszióra az MPN-ben, a hippocampus CA1 régiójában, az MS-ben és a vlVMN-ben nőstény (\mathcal{Q}) és hím (\mathcal{S}) egerekben 1 órával az E2 adása után. (*p<0,05). Terület rövidítések: lásd szöveg.

foszforiláció maximális szintet ért el a nőstények központi idegrendszerében. Az E2 kezelés

az előző kísérletekhez hasonlóan emelte a pCREB immunreaktív sejtek számát az MPN-ben, az MS-ben, a hippocampus CA1 régiójában, a vlVMN-ben (17. B ábra) és nem változtatta a gCTX-ben és a caudatum-putamenben. Ezzel ellentétben a gonadektomizált hímekben az E2 kezelés csak az MS-ben és a CA1-ben emelte a CREB foszforilációt, a többi területen nem (17. B ábra). Az ERK1/2 foszforiláció ugyanúgy változott a nőstény állatokban, mint az előző kísérletben. A gonadektomizált hím egerekben viszont az E2 kezelés nem változtatta meg az ERK1/2 foszforilációra egyik vizsgált területen sem. Az E2 kezelés nem változtatta meg az ERK1/2 és a CREB (17. A ábra) immunreaktivitást mutatató sejtek mennyiségét egyik kísérletben sem.

6.1.1.4. A genistein nem-klasszikus hatásai

A genistein ösztrogénszerű hatásai jól ismertek. Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a genistein miként hat a fejlődésben lévő idegrendszer CREB foszforilációjára. A vizsgálatokat a hypothalamus területén végeztük 15 perccel és 4 órával a genistein ill. az E2 beadása után neonatalis (14 napos) nőstény patkányokban. A western blot analízis megmutatta, hogy mind az E2 (33ng/g), mind pedig a genistein (33ng/g) képes emelni a CREB foszforilációt a hypothalamusban, a CREB expresszió változatlanul hagyása mellett (18. A,B ábra). A továbbiakban kvantitatív immunhisztokémiával elemeztük a genistein és az E2 hatását a beadás után 4 órával. Megvizsgáltuk a genistein hatását azon hypothalamikus területeken, melyeken jól ismert az ER α és ER β expressziója neonatális korban lévő patkányokban. Ezek a területek az AVPV, az MPN és a paraventrikuláris mag magnocellularis szubdiviziója (PVNm) voltak. Az E2 és a genistein dózisfüggő módon emelte a pCREB pozitív neuronok számát az MPN-ben és az AVPV-ben, de nem okozott változást az mPVN-ben (19. ábra). A CREB expresszió egyik anatómiai területen sem mutatott változást a különböző dózisú E2 vagy genistein kezelések után.



18. ábra. A Reprezentatív western blot minta mutatja a vivőanyag (V), a genistein (GEN) és az E2 hatását a pCREB, a CREB és az actin (belső kontroll) expresszióra 4 órával a beadás után. B A grafikonok mutatják a Western blot analízis eredményét a V, a GEN és az E2 adást követő 15 percen és 4 órán belül a hypothalamusban. A pCREB jelet a CREB jelhez normalizáltuk (p<0,05).



19. ábra. A mikrofotó mutatja a pCREB expressziót az MPN-ben a vivőanyag és a genistein adása után 4 órával. A grafikonok a genistein (B1) és az E2 (B2) dózis föggő hatását mutatják az MPN-ben, az AVPV-ben és a PVNm-ben. . (*p<0,05). 3V: III. agykamra. Terület rövidítések: lásd szöveg.

6.1.2 Következtetések

6.1.2.1 A klasszikus ösztrogén receptorok alapvető szerepe az E2 gyors hatásaiban

Kísérleteink megmutatták, hogy az E2 gyorsan, 15 percen belül képes foszforilálni a CREBet és az ERK1/2-t az agy különböző területein. Az ERαKO, ERβKO és ERα/ERβ KO egerekkel végzett kísérleteink egyértelmű bizonyítékot szolgáltattak arra, hogy az E2 nemklasszikus hatásai, mint a CREB foszforiláció, a klasszikus ösztrogén receptoroktól függenek. Az MS vizsgálatánál, amely területen javarészt ERβ mutatható ki, azt kaptuk, hogy a CREB foszforiláció az ERβ-tól függ. A vIVMN-ben azonban, amely főleg ERα-át expresszál, az E2 nem-klasszikus hatása ERα-tól függ. Érdekes módon a hippocampus CREB foszforilációja az $ER\beta$ -án keresztül történik, annak ellenére, hogy ezen a területen a hippocampus teljes volumenéhez viszonyítva alacsony az ERß expresszió. A caudatum-putamen és a gCTX területén, ahol az ösztrogén receptorok száma alacsony, nem tudtunk kimutatni E2 indukálta CREB illetve ERK1/2 foszforilációt. Az MPN vizsgálata szintén megerősítette az E2 nemklasszikus hatásának klasszikus ösztrogén receptoroktól való föggőségét. Ezen a területen, mindkét ösztrogén receptor típus, az ER α és az ER β is jelentős expressziós intenzitást mutat. Ugyanitt azonban az egyik illetve a másik ösztrogén receptor kiütése nem volt hatással az E2 indukálta CREB foszforilációra. Ez a jelenség arra utalhat, hogy a két receptor kompenzálhatja egymás hiányát. Valóban dupla génkiütött ER α /ER β KO egerekben megfigyelhető, hogy az E2 képtelen volt foszforilálni a CREB-et az MPN-ben. Ez a

megfigyelés azt is jelezte, hogy az ERαKO egerekben korábban, más kutatók által megfigyelt, esetlegesen előforduló reziduális ERα expresszió (Shughrue és mtsai., 2002) nem vesz részt az E2 gyors nem-klasszikus hatásainak közvetítésében. Korábbi in vitro vizsgálatok is megerősítették az ERα és ERβ felcserélhetőségének a lehetőségét (Razandi és mtsai., 1999; Migliaccio és mtsai., 2000; Wade és mtsai., 2001). Ezek az adataink tehát az első in vivo bizonyítékot szolgáltatták arra vonatkozólag, hogy bármelyik klasszikus ösztrogén receptor részt vehet az E2 nem-klasszikus hatásaiban.

A CREB foszforilációval ellentétben azt találtuk, hogy az E2 indukálta ERK1/2 foszforilációhoz mindkét receptor jelenléte szükséges. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az E2 kiváltotta ERK1/2 aktivációhoz az ERα és ERβ heterodimer formációja kell, amit több transzkripciós mechanizmusban korábban leírtak (Cowley és mtsai., 1997). Érdekes módon az ERβ hiánya az ERK1/2 alapfoszforilációját is befolyásolta kísérleteinkben. Metodikai okból kifolyólag csak néhány anatómiai területre korlátozódtak méréseink az ERK1/2 aktiváció vizsgálatában. Eredményeink azonban azt mutatták, hogy az E2 indukálta ERK1/2 foszforiláció ezeken a területeken a CREB aktivációnál megfigyelteknél komplexebb módon, de az ösztrogén receptoroktól függ. Érdekes, hogy korábbi in vitro adatok ellentmondásban vannak ezzel az in vivo következtetésünkkel, mivel Dorsa és munkatársai leírták, hogy az E2 kiváltotta MAPK aktivációhoz vagy az ERa vagy az ERβ elegendőnek bizonyultak (Singer és mtsai., 1999). Toran Allerand laboratóriumában folytatott in vitro vizsgálatok szerint pedig nem a klasszikus ösztrogén receptorok, hanem az ER-X mediálja az E2 indukálta ERK1/2 foszforilációt a neonatalis kortikalis területeken (Toran-Allerand és mtsai., 2002). Adataink szerint az agykéregben, vagyis a gCTX-ben az E2 nem volt hatással a pERK1/2 immunreaktivitásra, in vivo körülmények között.

A kapott eredmények, arra engednek következtetni, hogy kapcsolat van a klasszikus genomialis és a nem-klasszikus E2 indukálta folyamatok között. Korábbi *in vitro* neuroblastoma sejtvonalon végzett vizsgálatok megmutatták, hogy az ösztrogén nem-klasszikus folyamatai alapvető jelentőségűek az E2 genomialis transzkripciós mechanizmusainak beindításában (Vasudevan és mtsai., 2001). Egy másik osteoblastokon végrehajtott *in vitro* kísérletben arra jutottak, hogy valószínűleg a nem-klasszikus ösztrogén hatásokat a klasszikus ösztrogén receptor egy az eredeti állapottól eltérő konformációban közvetíti (Kousteni és mtsai., 2001). Ezek az eredmények tehát rámutatnak, hogy a klasszikus ösztrogén receptorok vezérlik az E2 jelátvivő rendszerekre gyakorolt nem-klasszikus hatásait a központi idegrendszerben.

6.1.2.2. Nemi különbségek az E2-indukálta CREB és ERK1/2 foszforilációra az agy különböző területein

Kísérleteinkben egyértelmű nemi különbségeket tapasztaltunk az MPN-ben és a vlVMN-ben. A korábbi kísérletek szerint ezek a területek részt vesznek a szexuális magatartásformák nemi különbségének kialakításában (Flanagan-Cato, 2000). Az MPN számtalan kémiai és strukturális nemi dimorfizmussal rendelkezik, aminek szerepe lehet a hím nemi szaporodási magatartásformák kialakításában (Vries, 1990; Simerly, 2002). Ezek a nemi külünbségek abból fakadhatnak, hogy az MPN-ben az ösztrogén receptorokat expresszáló neuronok száma illetve az ösztrogén receptort expresszáló neuronok fenotípusa nemi külünbséget mutat. Az ösztrogén receptor KO egereken elvégzett kísérleteink azt mutatták, hogy a nem-klasszikus hatások a klasszikus ösztrogén receptoroktól függenek, vagyis elképzelhető, hogy az ösztrogén nem-klasszikus hatásaiban megfigyelt nemi különbségeket az eltérő ösztrogén receptor eloszlás okozza. Az MPN-től eltérően jóval kevesebb nemi különbség mutatkozik a vlVMN-működésében (Grattan és Selmanoff, 1997; Sakuma, 2009). Ennek a területnek az ösztrogén indukálta nem-klasszikus hatása az ERa-tól függ, ezért elképzelhető itt is, hogy a nemi különbségért az ösztrogén receptor expresszió felelős. Ezen a területen azonban a nőstények és a hímek egyenlő arányban expresszálják az ERa-t (Herbison, 1994). Ezért lehetséges, hogy az ösztrogén receptor sejtmag felé irányuló jelátvitelében vannak nemi különbségek a vlVMN-ben. Mivel ez a terület fontos szerepet játszik a lordózis szabályozásában (Pfaff és Sakuma, 1979) valószínű, hogy az E2 indukálta nem-klasszikus hatások szerepet játszanak a nőstények szaporodási magatartásformáinak kialakításában.

Korábbi vizsgálatok megerősítették a nemi külünbségek jelenlétét a pCREB-et expresszáló neuronok tekintetében az MPN-ben, a vlVMN-ben és a CA1-ben (Auger és mtsai., 2001). Mindegyik területen a hímek több pCREB-et expresszálnak, ami érdekes módon lehet, hogy összefügg az újszülött hímek megnövekedett endogén ösztrogén expozicíójával (Auger és mtsai., 2001).

A hippocampus CA1-es régiójában és az MS-ben nem találtunk nemi különbségeket az E2 nem-klasszikus hatásában. Korábbi, hippocampusban végzett elektrofiziológiai vizsgálatok sem mutattak nemi különbségeket (Fugger és mtsai., 2001). Ezek az adatok azt is jelzik, hogy az E2-nek szexuálisan nemi különbséget mutató, a CA1 régióban a piramis sejtek dendrit tüske denzitására kifejtett hatása nem függhet a CREB foszforilációtól (Woolley és McEwen, 1993; Leranth és mtsai., 2003). Azonban az bizonyos, hogy az ERβ ebben a CREB foszforilációban fontos szerepet játszik. Mivel a hippocampusban relatíve alacsony az ERβ

expresszió (Mitra és mtsai., 2003), ezért feltételezhető, hogy ez a hatás közvetett módon az erre a területre irányuló ösztrogén szenzitív bemeneteken keresztül jön létre.

6.1.2.3. A genistein nem-klasszikus hatásai a neonatális agy hypothalamusában

Vizsgálatainkban igazoltuk, hogy az E2-höz hasonlóan a genistein is képes a hypothalamusban a CREB foszforiláció növelésére neonatális korban. Fontos megemlíteni, hogy ezt a hatást egy olyan dozírozással értük el, aminek a legmagasabb koncentrációja (330ng/g) is alacsony dózisnak számít az emberi táplálkozási adatok szerint csecsemő korban (Setchell és mtsai., 1998). A genistein CREB foszforilációt okozó hatásmechanizmusában feltehetőleg az ösztrogén receptorok fontos szerepet játszanak, mert a neonatalis hypothalamusban ERα és ERβ is expresszálódik (Perez és mtsai., 2003). Mivel a genistein affinitása az ERβ-hoz nagyobb (Kuiper és mtsai., 1998), ezért elképzelhető, hogy ez a receptor típus mediálja a genistein neonatalis hypothalamikus hatását. Azonban a genistein nem változtatta meg a CREB foszforilációt a főleg ERβ-t expresszáló PVN-ben (Perez és mtsai., 2003). Ezen kívül az AVPV-ben emelte a CREB foszforilációt, ahol az ERa expresszió dominál (Perez és mtsai., 2003). Ezek a megfigyelések rávilágíthatnak egy másik mechanizmus lehetőségére is. A genisteinről jól ismert, hogy a TrkB receptorra kifejtett tyrozin kináz inhibitor hatása (Yan és mtsai., 1997) mellett képes aktiválni az adenilát ciklázt (Liu és mtsai., 2005), ami fontos kezdő lépcsője a CREB foszforilációhoz vezető jelátvivő kaszkád rendszernek és így kísérleteinkben is szerepe lehetett.

Az AVPV jelentős szerepet játszik a fertilitás szabályozásában, míg az MPN a szexuális magatartás szabályozásában alapvető fontosságú (Wiegand és Terasawa, 1982; Kartha és Ramakrishna, 1996). Állatkísérletekben a genistein neonatalis adagolása volumetrikus elváltozásokat okoz az AVPV-ben és az MPN-ben (Patisaul és Polston, 2008), valamint megzavarja az ösztrusz ciklust és a szexuális magatartásban fontos szerepet játszó lordózis gátlásával is jár (Kouki és mtsai., 2003). A jelenlegi kísérleti eredményeink arra engednek következtetni, hogy a genistein CREB foszforilációt indukáló hatása az AVPV-ben és az MPN-ben szerepet játszhat a felnőtt korban megfigyelhető genisteinnel összefüggésbe hozható fertilitási és szexualis magatartási anomáliák kialakulásában.

6.2. Az E2 nem-klasszikus hatásai a GnRH neuronokon (2,9,14,12)

Az E2 visszacsatolás egyik alapvető cél neuron csoportja a GnRH neuronok. Ebben a kísérletsorozatban az E2 gyors, nem-klasszikus hatásait vizsgáltuk a GnRH neuronok membránpotenciáljára, az intracelluláris Ca²⁺ szintjére, a CREB foszforilációra és az abban részt vevő jelátviteli rendszerekre. A Ca²⁺ mérésekhez nőstény GnRH-pericam állatokból származó túlélő agyszeleteket használtunk. Az elektrofiziológiai vizsgálatainkhoz GnRH-GFP transzgenikus egerekből származó túlélő agyszeleteket alkalmaztunk. Az ösztrogén receptorok szerepének vizsgálatát nőstény GnRH-ERβKO illetve GnRH-pericam/ERβKO egereken végeztük. A GnRH neuronban az ERK1/2 és a CREB foszforilációt kettős jelöléses immunhisztokémiával határoztuk meg.

6.2.1. Eredmények

6.2.1.1. Az E2 gyors hatása a GnRH neuron Ca²⁺ dinamikájára

A GnRH neuronok nagy része mutatott lassú Ca^{2+} tranzienseket illetve nem mutatott Ca^{2+} tranzienseket egyáltalán. A kísérleteinkben azokat az rPOA-ban elhelyezkedő GnRH neuronokat teszteltük, amelyek kevesebb, mint 8 Ca^{2+} tranzienst mutattak óránként. Ezekben a kísérletekben az E2-t növekvő mennyiségben adagoltuk folyamatosan (1, 10, 100 nM) 15 percen keresztül, majd E2 mentes ACSF-fel áramoltattuk át az agyszeleteket. 27 darab GnRH neuronból 13 (48%) növelte a Ca^{2+} tranziensek számát E2 hatására (a 100 nM-os kezelésnél vált szignifikáns hatásúvá az E2 kezelés) (20. ábra) és 14 nem mutatott változást az E2 kezelés alatt. A Ca^{2+} tranziensekben tapasztalható növekedés gyakran megmaradt még a kimosás után is. A túlélő agyszeletekhez a kísérlet végén 30 mM koffeint adtunk, mely jellemző Ca^{2+} tranziens változást okozott (21. ábra). Ezzel ellenőriztük az adott sejt Ca^{2+}



20. ábra Az E2 stimulálja a Ca^{2+} tranzienseket a GnRH neuronban. A Az emelkedő E2 koncentricó hatására bekövetkezett reprezentatív Ca^{2+} tranziens növekedés. A Ca^{2+} szint időbeli alakulását mutatja a szürke vonal, míg a piros a Daubechies 4 wavelet transzformációval kapott eredményt jelzi. **B** A digram az E2 hatását mutatja a Ca^{2+} tanziensek ferkevenciájára 15 perces intervallumban (kimosási periódust is beszámítva) különböző koncentrációjú E2 kezeléseknél a GnRH neuronokban (n=13, ***, p<0,001)

homeosztázisának az integritását. A GnRH Ca^{2+} neuronok tranzienseiben megfigyelt változások nem mutattak anatómiai specificitást. Az állatok ösztrusz státusza sem befolyásolta az E2 Ca^{2+} indukálta tranziensek növekedését. A kezdeti

eredmények azt is megmutatták, hogy bizonyos idő telik el az E2 alkalmazása és Ca^{2+} а

tranziensekben

megfigyelhető növekedés között. Ezért megvizsgáltuk a Ca²⁺ válasz latenciáját is 100pM, 1nM, 10nM illetve 100nM E2 kezeléseket követően. Ezekben a vizsgálatokban mindegyik koncentráció hatékonynak bizonyult és a latencia átlagosan 15 percnek adódott.

DRB, RNS szintézis blokkolót alkalmaztunk azért, hogy megvizsgáljuk, hogy az E2 gyors hatásából mennyire zárhatók ki a transzkripcionális hatások. Méréseink azt mutatták, hogy a 150µM-os DRB-vel történő előkezelés nem befolyásolta az E2 Ca²⁺ tranziens növelő hatását.

21. ábra Az intracelluláris receptorok kellenek az E2 indukálta Ca²⁺ tranziens növekedéshez. A Ca²⁺ szint időbeli alakulását mutatja a szürke vonal, míg a piros a Daubechies 4 wavelet transzformációval kapott eredményt jelzi. A reprezentatív felvételek mutatják a BSA-E2, a 17 α -E2 és a G1 kezelések hatástalanságát a Ca²⁴ tranziensekre a GnRH neuronokban. Minden megvizsgált GnRH neuron válaszolt a koffein (caff) alkalmazására (n=13, ***, p<0,001)



dc_474_12

А következő lépésben meghatároztuk az E2 hatás helyét és specificitását GnRH a neuronon. Ezért először a membrán ösztrogén receptorokat vizsgálva a szeleteket membrán impermeábilis E2-BSA-val (100nM), GPER1 agonista G-1-gyel (100 nM) illetve az inaktív E2 izomerjével, 17α -ösztradiollal (100nM) kezeltük. Ezek közül semelyik vegyület sem bizonyult hatékonynak a Ca^{2+} tranziensek változtatásában (21. ábra). A következő kérdésünk az volt, hogy a klasszikus



22. ábra. Az E2 indukálta Ca^{2+} tranziens emelkedést az ERa mediálja a GnRH neuronban. A Ca^{2+} szint időbeli alakulását mutatja a szürke vonal, míg a piros a Daubechies 4 wavelet transzformációval kapott eredményt jelzi. A reprezentatív felvételek azt mutatják, hogy az E2 Ca^{2+} tranziens emelkedést indukál a pericam-GnRH/ER β KO egerekben (A) a szelektív ERa agonista 16a-LE2-hoz hasonlóan (B). A diagramok mutatják a Ca^{2+} tanziensek ferkevencia változását a pericam-GnRH/ER β KO egerekben különböző koncentrációjú E2 kezelések hatására (C) és 100 nM 16a-LE2 vagy E2 kezelések után (D) (***, p<0,001 az ACSF kezeléssel összehasonlítva).

ösztrogén receptorok milyen szerepet játszanak ebben a jelenségben. Mivel a GnRH neuronok kizárólag ERβ-át expresszálnak (Hrabovszky és mtsai., 2001), ezért a kísérleteinket először pericam-GnRH/ERβKO egereken végeztük, amelyekben a pericam-GnRH neuronokban hiányzik az ERβ. Ezek a mérések azt mutatták, hogy az E2 ugyanúgy emelte a Ca^{2+} tranziensek számát a pericam-GnRH/ERβKO egerek GnRH neuronjaiban (50%), mint azok vad típusú kontroll egyedeiben (48%) (22. ábra). Azért, hogy az ERα lehetséges szerepét is megvizsgáljuk 10 és 100 nM ERα agonista, 16α-LE2-t adtunk. 10 nM-os 16α-LE2 hatására 10 GnRH neuronból 2 válaszolt a Ca^{2+} tranziensek emelkedésével. 100 nM 16α-LE2 adása pedig tovább növelte a hatást, mivel 20 GnRH neuronból 10 esetében növekedett a Ca^{2+} tranziensek száma (22. B,D ábra).



23. ábra. Az E2 indukálta Ca^{2+} tranziens növekedést az akciós potenciál független GABA felszbadulás mediálja a GnRH neuronokban. A Ca^{2+} szint időbeli alakulását mutatja a szürke vonal, míg a piros a Daubechies 4 wavelet transzformációval kapott eredményt jelzi. (A) A reprezentatív felvételek azt mutatják, hogy az E2 a TTX jelenlétében igen, de a GABA_A receptor blokkoló gabazin jelenlétében nincs hatással a Ca^{2+} tranzeinsekre A GABA kezelés TTX jelenlétében (C) és annélkül (B) is Ca^{2+} tranzies emelkedést idéz elő a GnRH neuronban.

Korábbi kísérletek szerint a GnRH neuronban Ca^{2+} megfigyelhető tranziensekért IP3 az receptorokból származó Ca²⁺ tehető felelőssé (Jasoni mtsai., 2007). és Kísérleteinkben IP3 az receptorok 2-ABP-vel való blokkolása sikeresen gátolta az E2 Ca²⁺ tranziensekre gyakorolt hatásait.

További vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy az E2 közvetlenül a GnRH neuronra hatva vagy közvetett módon az interneuronokon keresztül, emeli a GnRH neuron Ca²⁺

tranzienseit. Először TTX-et használtunk, mely blokkolta az akciós potenciál függő transzmitter felszabadulást. Ezek a vizsgálatok azt mutatták, hogy 10 GnRH neuronból 3 neuronban az E2 emelte a Ca²⁺ tranziensek számát, amely azt sugallja, hogy az E2 hatása közvetlenül a GnRH neuronokon valósulhat meg (23. A ábra). Ez a megfigyelés azonban ellentmondásban van azzal az adatunkkal, miszerint az E2 hatást az ER α közvetíti, mert a GnRH neuronok nem tartalmazzák ezt az ösztrogén receptor típust, és így az E2-nek indirekten kéne hatnia. Feltételeztük korábbi elektrofiziológia kísérletek alapján, hogy ebben a folyamatban akciós potenciál független GABAerg neurotranszmisszió is részt vehet (Sim és mtsai., 2000; Christian és Moenter, 2007). Ezért elvégeztük a kísérletet 1 mM gabazin, GABA_A receptor gátló jelenlétében is. A gabazin a bicuculinnal ellentétben nem mutatott fluorescenciát, abban a hullámhossz tartományban, amiben a pericam és blokkolta az összes inhibitorikus posztszinaptikus áramot (IPSC) a GnRH neuronban. TTX és gabazin jelenlétében 13-ból 13 GnRH neuronokban (23. A ábra). Ez a jelenség arra is utalt, hogy a

GABA képes a GnRH neuronban közvetlenül a Ca²⁺ tranziensek emelésére. Valóban TTX és 50 mM GABA együttes alakalmazása esetén 11-ből 6 GnRH neuronban emelkedet a Ca²⁺ tranziensek száma (23. B,C ábra).



24. ábra. Az E2 mIPSC burst-et indukál a GnRH neuronokban. A Whole cell patch clamp fevételek TTX és glutamát receptor antagonista CNQX és AP-5 jelenlétében 15 perces 100 nM-os E2 adás esetén. B Reprezentatív felvétel egy GnRH neuronról, amelyik nem reagál az E2 kezelésre (a felső részen a regisztrátum, az alsó részen az mIPSC ferekvencia hisztogramja látható). C-F Négy db GnRH neuron frekvencia hisztogramja, amelyek késleltetett mIPSC burst-tel (*p<0.05) válaszoltak az E2 kezelésre.

6.2.1.2. Az E2 hatása az IPSC-re a GnRH neuronban

Az előző eredmények arra utaltak, hogy az E2 képes az akciós potenciál független GABA transzmisszió növelésére a GnRH neuronokon. Azért, hogy közvetlenül megvizsgáljuk ezt a feltevésünket, GABA_A receptor áramokat mértünk a GnRH neuronokon whole cell patch clamp technikával GFP-GnRH egerek túlélő agyszeletein. Az IPSC mérések megbízhatóságát a TTX mellé adott glutamát receptor antagonisták, AP-5 és CNQX, alkalmazásával értük el. A miniatűr IPSC (mIPSC) átlag ferekvenciája $0,75 \pm 0,2$ Hz-nek, amplitúdója $29,5 \pm 3,3$ pA-nek, a decay ideje $15,5 \pm 0,7$ ms-nak adódott. Az mIPSC blokkolható volt GABA_A receptor antagonista bicuculinnal vagy gabazinnal, ami mutatja az akciós potenciál független GABA_A

receptorok aktivációjának jelenlétét a GnRH neuronokon. Kísérleteink egyértelműen megmutatták, hogy 100 nM-os E2 15 percen keresztül adva jelentős emelkedést (burst) okoz az IPSC-ben, 17 GnRH neuronból 4 esetében. A többi GnRH neuronban az IPSC frekvenciája és karakterisztikája nem változott a kezelés hatására (24. ábra).

6.2.1.3. Az E2 hatása a CREB foszforilációra a GnRH neuronban

Az E2 növelte a Ca²⁺ tranzienseket a GnRH neuronokban. A Ca²⁺ tranziensekről ismert, hogy alapvető szerepet játszanak a jelátvivő molekulák és a transzkripciós faktorok, mint pl. a CREB aktivációjának szabályozásában (Shaywitz és Greenberg, 1999; Kornhauser és mtsai., 2002). Ezért megvizsgáltuk az E2 hatását a CREB foszforilációra a GnRH neuronokban. Ebben a kísérletsorozatban immunperoxidáz hisztokémiával határoztuk meg az E2 hatását a CREB foszforilációra és a CREB expresszióra a GnRH neuronokban 15 perccel, 1 órával és 4 órával az E2 injekciója után ovariektomizált egerekben *in vivo*. Kísérleteink megmutatták, hogy 33 ng/g E2 szubkután injekciója szuprafiziológiás szintre emelte a vérplazma E2 koncentrációját valamennyi vizsgált időpontban, 15 perc (vivőanyag:



25. ábra. Az E2 gyorsan idő és dózis függően foszforilálja a CREB-et a GnRH neuronban. Az grafikonok a CREB-et (A) és a pCREB-et (B) expresszáló GnRH neuronok %-os arányát mutatják 15 perccel, lórával és 4 órával az E2 adása után OVX egerekben.(*p<0,05) C, A grafikon a pCREB-et expresszáló GnRH neuronokat mutatja külünböző E2 dózis esetén 1 órával az injekció után. Az adatokat a vivőanyag adása után megfigyelt értékek %-ban fejeztük ki. (*p<0,05) D, A mikrofotó a pCREB immunreaktivitást (fekete) mutatja a GnRH neuronban (barna). A kalibrációs egyenes 20 µm.

3,42±1,44 pg/ml; E2: 854,39±197,45 pg/ml; p<0,05), 1 óra (vivőanyag: 2,37±1,51 pg/ml; E2: 492,91±80,89 pg/ml; p<0,05), és 4 óra (vivőanyag: 6,01±0,38 pg/ml; E2: 225,35±92,54 pg/ml; p<0,05).

Eredményeink is azt igazolták, hogy a pCREB és a CREB immunreaktivitás a GnRH neuronok sejtmagjaiban volt megfigyelhető (25. D ábra). Az E2 kezelés hatására GnRH neuronok száma nem a változott egyik időpontban sem. Ellenben a pCREB-et expresszáló GnRH neuronok száma 6-7-szeresére emelkedett 15 perccel a beadás után, majd 1 óra múlva érte el a maximumát és 4 óra elteltével is

szignifikánsan magas szintet mutatott (25. B ábra). Ezzel szemben a GnRH neuronok száma

és a CREB expressziója nem változott (25. A ábra). A CREB és a pCREB expresszió nem mutatott anatómiai különbségeket sem, mivel nem találtunk eltéréseket az MS-ben, az rPOAban illetve az AHA-ban lévő GnRH neuronok CREB illetve pCREB expressziója között. A



CREB foszforiláció mértéke az alkalmazott E2 dózisától függött, amit a 3,3 és a 33 ng E2 dózis-hatás grafikonja mutatott (25. C ábra).

A GnRH neuronok CREB foszforilációjában nemi különbségeket is találtunk, mivel 33ng/g

26. ábra Az E2 indukálta CREB foszforiláció szexdimorfizmust mutat. A A mikrofotó a pCREB immunreaktivitást (fekete) mutatja a hím GnRH neuronban (barna). A kalibrációs egyenes 20 µm. A grafikonok a CREB-et és a pCREB-et expresszáló GnRH neuronok %-os arányát mutatják lórával a vivőanyag és az E2 adása után gonadektómizált nőstény (\mathfrak{P}) és hím (\mathfrak{F}) állatban.(*p<0.05)

E2 adása gonadektomizált hím egerekben nem foszforilálta a GnRH-ban lévő CREB-et (26. ábra). A hím egerek GnRH neuronjában mért CREB alapfoszforiláció szignifikánsan magasabb volt, mint a nőstényekben. A CREB-et expresszáló GnRH neuronok száma hímekben hasonló volt, mint nőstényekben és nem mutatott változást az E2 kezelést követően sem (26. ábra). A GnRH neuronok száma ugyancsak változatlan maradt E2 kezelés után a hím állatokban.

6.2.1.4. Az ösztrogén indukálta CREB foszforiláció jelátviteli útvonalai a GnRH neuronban

A CREB foszforiláció regulációjában a MAPK jelátviteli útvonal jelentős szerepet játszik (Shaywitz és Greenberg, 1999), ezért megvizsgáltuk az ERK aktivációt a GnRH neuronokban. Vizsgálatainkban kettős jelöléses fluorescens immunhisztokémiával mutattuk ki az ERK1/2 és a pERK1/2 expressziót a GnRH neuronokban E2 adása után 15 perccel, 1 órával és 4 órával. Az ERK1/2 immunreaktivitás az idegsejtek citoplazmájára korlátozódott, a pERK1/2 expresszió a citoplazmán kívül a magban is kimutatható volt (27. A ábra). A GnRH neuronok számának változatlanul hagyása mellet az E2 a pERK1/2-t expresszáló neuronok számát jelentősen növelte 15 percen belül, majd ez az érték 1 óránál az alapértékre esett vissza (27. B ábra). Az ERK1/2 expresszió a GnRH neuronokban nem változott (27. E ábra). A pERK1/2 expresszió növekedése anatómiai sepcificitást mutatott, mivel egyedül az rPOA területén lévő GnRH neuronokban volt szignifikáns (27. D ábra).

További vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy az ERK1/2 aktiváció részt vesz-e az E2 indukálta CREB foszforilációban. Ezekben a kísérletekben szelektív MEK1/2 (ERK1/2 aktivátor kináz) inhibitort, U0126-ot alkalmaztunk túlélő agyszeleteken és az E2 indukálta CREB foszforilációt kettős jelöléses immunperoxidáz hisztokémiával mutattuk ki, 15 perccel az E2 alkalmazása után. Hasonlóan az *in vivo* vizsgálatban tapasztaltakhoz a GnRH neuronokban lévő CREB és a pCREB magi lokalizációt mutatott (28. A ábra) és a pCREB-et expresszáló GnRH neuronok száma szignifikánsan megemelkedett az E2 adása után 15 percen belül. Az 1µM U0126 alkalmazása blokkolta ezt az emelkedést a GnRH



27. ábra Az E2 gyorsan idő függően foszforilálja az ERK1/2-t a GnRH neuronban. A A mikrofotó kettős jelöléses immunfluorescenciát mutat, ahol a pERK1/2 piros a GnRH neuron zöld színű. A kalibrációs egyenes 20 μ m. **B** A sematikus ábra az ERK1/2 expresszióval rendelkező GnRH neuronok eloszlását mutatja az MS-ben, az rPOA-ban és az AHA-ban. A grafikonok a pERK1/2-t (**C**) illetve az ERK1/2-t (**E**) expresszáló GnRH neuronok %-os arányát mutatják 15 perccel, 1órával és 4 órával a vivőanyag illetve az E2 adása után, valamint 15 perccel az E2 adása után az ERK1/2-t expresszáló GnRH neuronok expresszióját különböző agyterületeken az MS-ben, az rPOA-ban és az AHA-ban (**D**)(*p<0,05). Anatómiai terület rövidítések: lásd szöveg.

neuronokban az alap foszforiláció CREB vátozatlanul hagyása mellett (28. B ábra). A GnRH neuronok számát és CREB expresszióját sem az E2 sem pedig az U0126 nem befolyásolta. А immunoreaktív pCREB neuronok száma itt is specifikus anatómiai eloszlást mutatott, mivel kizárólag az rPOA-ban lévő GnRH neuronoknál mutatkozott meg a hatás (MS, vivőanyag: 34,2 ± 12,2%, E2: 44,1±8,2%; rPOA, vivőanyag: 27,6±2,8%, E2: $42,2\pm5,1\%,$ р < 0,05; AHA, vivőanyag: $11,6\pm7,2\%,$ E2: 44,6±16,1%).

Vizsgálataink azt mutatták, hogy az ERK1/2 aktivációja kell a CREB foszforilációjához a GnRH neuronokban. Korábbi kísérletek azonban azt igazolták, hogy más jelátvivő rendszerek is részt vehetnek a CREB foszforilációban. Ezért a következő lépésben a PKA, a CaMKII és a PKC jelátvivő pályarendszerek szerepét tanulmányoztuk az E2 indukálta CREB foszforilációban a GnRH neuronokban. Ezeket a vizsgálatokat specifikus blokkolók, így H-89, AIP és GF109203X segítségével végeztük túlélő agyszeletekben *in vitro*. Méréseink azt mutatták, hogy sem az E2 sem pedig a blokkolók nem változtatták meg a GnRH neuronok számát. Az előző kísérletekhez hasonlóan az E2 emelte a CREB



28. ábra. Az E2 az ERK1/2, a PKA-n és a CaMKII jelátvivő pályarendszereken keresztül foszforilálja a CREB-et és az ERK1/2-t a GnRH neuronban. A A mikrofotó a pCREB immunreaktivitást (fekete) mutatja a hím GnRH neuronban (barna). A kalibrációs egyenes 20 µm. **B-E** A grafikonok a pCREB-et expresszáló GnRH neuronok %-os arányát mutatják 15 perccel a vivőanyag illetve az E2 adása után U0126, H-89, AIP vagy GF109203X jelenlétében.(*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

foszforiláció mértékét a GnRH neuronokban (28. D-E ábra). Azonban 10 μ M H-89-es és 10 μ M-os AIP kezeléssel ezt az emelkedést blokkolni tudtuk (28. D,C ábra), de a 100 nM GF109203X-nek nem volt hatása (28. E ábra). Egyik antagonista sem befolyásolta az alap CREB foszorilációs szintet. Az előző kísérletekhez hasonlóan a GnRH neuronokban az E2 adása utáni megnövekedett CREB foszforiláció itt is az rPOA-ban lévő GnRH neuronokra korlátozódott. A GnRH neuronok CREB expresszióját sem az E2, sem pedig az inhibitorok nem változtatták meg.



azt mutatják, hogy a PKA és a CaMKII jelátvivő útvonalak szabályozzák a CREB foszforilációt. Ezt követő vizsgálatainkban, arra kerestük a választ, hogy ez a szabályozás a jelátvivő pályarendszerek

Kísérleteink

melyik szintjén történik. Ezért megvizsgáltuk az inhibitorok hatását az E2 indukálta ERK1/2 foszforilációra *in vitro*. Kettős jelöléses immunhisztokémiával történt vizsgálataink azt mutatták, hogy hasonlóan az in vivo kísérletekhez az E2 emelte az ERK1/2 foszforilációt a GnRH neuronokban 100 nM E2 alkalmazása után 15 percen belül (29. A-C ábra). Ebben a kísérletben is hatékonynak találtuk a H-89-et és az AIP-ot (29. A-B ábra), és a GF109203X itt sem mutatkozott hatásosnak (29. D ábra). A GnRH neuron pERK1/2 emelkedése ebben a kísérletben is az rPOA-ra korlátozódott. A GnRH neuronokban az ERK1/2 expressziója nem változott az E2 és az inhibitorok adása után sem.

6.2.1.5. Az indirekt transzszinaptikus és a közvetlen folyamatok szerepe az E2 indukálta ERK1/2 foszforilációban a GnRH neuronokon

További vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy az E2 hatása közvetlenül a GnRH neuronokon vagy közvetett módon interneuronokon keresztül valósul meg. Azt is vizsgálni kívántuk, hogy ezekben a folyamatokban milyen szereppel rendelkezik a GnRH neuronokban kifejeződő ERβ receptor. Ahhoz, hogy mind a direkt hatásra, mind a nem-klasszikus E2 hatás ERβ függőségére egyaránt választ kapjunk vizsgálatainkat Cre-LoxP technológiával létrehozott GnRH-ERβ KO egereken végeztük, amelyekből szelektíven csak a GnRH neuronokból ütöttük ki az ERβ-át. Így az E2-indukálta CREB és ERK1/2 foszforilációt GnRH-ERβ KO egereken vizsgáltuk az E2 adása után 15 perccel *in vivo*. Mivel egérben nem tudjuk kimutatni az ERβ-t immunhisztokémiával a GnRH neuronokban, ezért megvizsgáltuk a Loxp rekombináció neuroanatómiai specificitását. A PCR vizsgálatok megmutatták, hogy az rPOA-ban igen, de a cerebellumban nem következik be az ERβ gén rekombinációja, ami



30. ábra Az E2 az ERβ-án keresztül foszforilálja az ERK1/2-t és a CREB-et a GnRH neuronban. A grafikonok a pERK1/2-t (A) és a pCREB-et (B) expresszáló GnRH neuronok %-os arányát mutatják vad típusú és GnRH-ERβKO egerekben 15 percen belül a vivőanyag illetve az E2 adása után in vivo (***p<0,001).



Egy

következő túlélő agyszeleten végzett in vitro kísérletben azt is megvizsgáltuk, hogy a GnRH neuronok afferens neuronjai milyen szerepet E2 játszanak az nemklasszikus hatásainál а GnRH neuronokon. Ezekben a kísérletekben inhibitor koktélt alkalmaztunk, mely TTXet, glutamát receptor és GABA receptor blokkolókat, vagyis CNQX-et és picrotoxint, AP5-öt tartalmazott. Az inhibitor koktél sikeresen blokkolta az E2-indukálta



31. ábra Az E2 közvetetten interneuronokon keresztül foszforilálja az ERK1/2-t a GnRH neuronban. A A mikrofotó kettős jelöléses immunfluorescenciát mutat, túlélő agyszeletben ahol a pERK1/2 piros a GnRH neuron zöld színű. A kalibrációs egyenes 20 μm. B A grafikon a pERK1/2-t expresszáló GnRH neuronok %-os arányát mutatja 15 perccel a vivőanyag illetve az E2 adása után, TTX, picrotoxin, AP5 és CNQX jelenlétében vagy anélkül (***p<0,001).

ERK1/2 foszforilációt és hasonlóan a korábbiakhoz fokozott pERK1/2 expressziót mutatott az rPOA-ban elhelyezkedő GnRH neuronokban (31. ábra).

6.2.1.6. A fiziológiás E2 koncentráció szerepe a nem-klasszikus folyamatokban a GnRH neuronokban

Az in vitro vizsgálatainkban használt 100 nM-E2 koncentráció a kutatók széles körében os alkalmazott, azonban ez a dózis nem tekinthető fiziológiásnak (Herbison, 2009). Ezért annak érdekében, hogy az eredményeinket fiziológiásan "megfelelő" kontextusba helyezzük kétféle elrendezésben végeztük el újra a kísérleteket. Először ovariektomizált (minimális E2 szinttel rendelkező) és diösztruszban lévő áloperált egerek GnRH neuronjainak pERK1/2 szintjét hasonlítottuk össze in vivo. Α második kísérletsorozatban ezerszer alacsonyabb E2 koncentrációt, 100 pM-t használva vizsgáltuk a GnRH neuronok CREB foszforilációját in vitro túlélő agyszeletben. Az első kísérletben azt kaptuk, hogy az ovariektomizált egerekben a GnRH neuronoknak csak kis hányada expresszált pERK1/2-t, azonban a proösztruszos egereknél kétszer annyi



32. ábra Az E2 hatás fiziológiás körülmények között is érvényesül. A A grafikon a pERK1/2-t expresszáló GnRH neuronok %-os arányát mutatja OVX és intakt proösztruszban lévő egerekben (***p<0,001). B A grafikon a pERK1/2-t expresszáló GnRH neuronok %-os arányát mutatja túlélő agyszeletben vivőanyag (V) és 100 pM-os E2 akalmazását követően 15 percen belül.

GnRH neuron rendelkezett pERK1/2-vel (32. A ábra). Az ovariektómia nem befolyásolta a GnRH neuronok számát és az ERK1/2 expresszióját. A második, *in vitro* kísérletsorozat megmutatta, hogy 100 pM E2 is képes szignifikánsan emelni a CREB foszforilációt a GnRH neuronokban (32. B ábra). Ebben a kísérletben sem változott a GnRH neuronok száma illetve a pCREB expressziója az E2 adását követően.

6.2.2. Következtetések

6.2.2.1. Az E2 nem-klasszikus hatása emeli a Ca²⁺ tranzienseket a GnRH neuronokban

A sejtek jelátvivő útvonal hálózatának egyik legfontosabb eleme a Ca^{2+} mely igen sok jelátvivő molekula működését szabályozza (Shaywitz és Greenberg, 1999). A vizsgálataink megmutatták, hogy az E2 egyértelműen növelte a Ca^{2+} tranzienseket a GnRH neuronokban.

Az ERBKO állatokkal és ösztrogén receptor antagonistákkal elvégzett kísérleteink azt is megmutatták, hogy az intracellulárisan elhelyezkedő ER α -án keresztül az E2 emeli a Ca²⁺ tranziensek mennyiségét a GnRH neuronokban. Mivel ERa nem található a GnRH neuronokban (Herbison és Pape, 2001), ezért elképzelhető, hogy az E2 interneuronokon keresztül éri el a hatást. Ez a feltevés és az, hogy a Ca^{2+} tranziens emelkedés nem függ az akciós potenciál dependens szinaptikus neurotranszmissziótól, arra engedett következtetni, hogy az E2 Ca²⁺ tranziensekre gyakorolt hatásaiban a GnRH neuronok akciós potenciál független GABAerg szabályozása is szerepet játszhat. Ezt a hipotézisünket alátámasztotta az a kísérlet, amelyben GABA_A receptor antagonista és TTX jelenlétében az E2 hatását gátolni tudtuk. A második kísérletünk tovább erősítette ezt az elképzelésünket, mivel azt kaptuk, hogy az E2 képes emelni az mIPSC-t a GnRH neuronokban, vagyis az E2 képes növelni a GnRH neuronokat célzó, akciós potenciál független GABA felszabadulását. Azonban azt nem tudjuk, hogy az E2 kiváltotta GABA iniciálta Ca²⁺ tranziens emelkedés milyen mechanizmussal megy végbe. Kimutattuk, hogy ez a mechanizmus a nem-klasszikus hatásokhoz kötődik, mivel nem függ a géntranszkripciótól, és azt is, hogy valamilyen mechanizmus szerint az IP3 receptoroktól függ. Érdemes megjegyezni, hogy annak ellenére, hogy a korábbi kísérletekben is leírtak hasonló E2 kiváltotta Ca²⁺ tranziens emelkedést a GnRH neuronokban, e kísérletek eltéréseket mutattak a mi vizsgálatainktól (Temple és mtsai., 2004; Abe és mtsai., 2008). Majom idegsejt kultúrában a Ca²⁺ tranziensek emelkedéséhez például membrán ösztrogén recepció kellett (Abe és mtsai., 2008), míg egér idegsejt kultúrában ez a jelenség az ERα-án keresztül zajlott le (Temple és mtsai., 2004). Talán a legfontosabb különbség az, hogy a mi kísérletünk volt az első, ahol felnőtt GnRH neuronban írtuk le a folyamatot, és a többi eredménnyel együtt ez felhívhatja arra is a figyelmet, hogy az E2 hatásában különbség mutatkozik embrionális és felnőtt korban a Ca^{2+} reguláció tekintetében.

6.2.2.2. Az E2 a PKA/CaMKII-ERK1/2 szignáltranszdukciós rendszeren keresztül aktiválja a CREB-et a GnRH neuronokban

A Ca²⁺ tranziensek növekedése jelentősen emeli a CREB foszforiláció mértékét a sejtekben (Shaywitz és Greenberg, 1999), ezért valószínűsíthető, hogy az E2 adása emeli a CREB foszforilációt a GnRH neuronokban. Valóban, *in vivo* kísérleteinkben megmutattuk, hogy az E2 gyorsan (<15 perc), dózisfüggő módon növelte a GnRH neuronokban a CREB foszforilációt és ez 1 óra illetve 4 óra múlva is megfigyelhető volt. Érdekes módon ez a foszforiláció a hím állatokban hiányzott és az alap foszforilációs szint is nagyobb volt a

CREB-nél a hím GnRH neuronokban, ami a GnRH neuronok szignáltranszdukciós útvonalainak szexdimorfizmusára utal.

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy milyen jelátviteli útvonalak állhatnak ennek hátterében. Az E2 indukálta ERK1/2 foszforiláció tranziensnek adódott, 15 percnél érte el a maximumát, ami arra engedett következtetni, hogy az ERK1/2 foszforiláció megelőzi, és talán befolyásolhatja a CREB foszforilációt. Ezt a feltevésünket a MEK1/2 inhibitorral történt *in vitro* kísérleteink megerősítették. További *in vitro* kísérleteink azt is megmutatták, hogy a PKC jelátvivő rendszerrel ellentétben a PKA és a CaMKII alapvető szerepet játszanak az E2 kiváltotta CREB és ERK1/2 foszforilációban. A PKA és az ERK1/2 közötti kommunikációs útvonalak ismertek (Impey és mtsai., 1998), azonban a CaMKII és a PKA közötti jelátviteli kapcsolatról nincs szakirodalmi adat.

6.2.2.3. Az E2 nem-klasszikus hatásának támadáspontjai a GnRH neuronban: ERK1/2, mint koincidencia detektor

Mivel **ERK1/2** az foszforiláció a transzszinaptikus aktiváció részeként jöhet létre, ezért feltételeztük, hogy az E2 transzszinaptikusan váltja ki az ERK1/2 foszforilációt a GnRH neuronban. Megfigyeltük, hogy TTX és glutamát/GABA_A blokkoló receptor együttes alkalmazásakor az E2 nem volt hatással az ERK1/2foszforilációra. Ez arra enged következtetni, hogy E2 az indirekten hat az ERK1/2 és a CREB foszforilációra a GnRH neuronban. Korábbi kísérleteinkből tudjuk, hogy a TTX önmagában nem gátolta a CREB foszforilációt (3), de



33. ábra A nem-klasszikus ösztrogén hatások lehetséges mechanizmusai a cAMP response element binding protein (CREB) foszforilációt szabályozó intracelluláris jelátvivő rendszereken GnRH neuronban. Az E2 az interneuronokban lévő ösztrogén receptorokon keresztül a GABA vagy glutamát neurotranszmisszión át Ca^{2+} tranziens emelkedés közvetítésével nőveli a CREB foszforilációt. A másik útvonal az ERβ-án keresztül a ERK1/2 illetve a CamKII és a PKA közvetítésével történik. Az ERK1/2 koincidencia detektorként működik. Rövidítések: PKA: protein kináz A, MAPK: mitogen-activated protein kináz, E2: 17 β ösztradiol, CaM: calmodulin, CaMKII: calcium calmodulin kináz II, ERK1/2: extracellular signal regulated kináz, IP3R: inositol 3 foszfát receptor.

glutamát/GABAA receptor blokkolókkal együtt adva igen. Ez azt jelentheti, hogy az akciós potenciál dependens és independens neurotranszmissziós folyamatok együttes gátlása esetén tünik el az E2 nem-klasszikus hatása a GnRH neuronokon. Így elképzelhető az, hogy az E2 az akciós potenciál független GABAerg neurotranszmisszió felerősítése révén modulálja a jelátviteli rendszereket a GnRH neuronokban. Kísérleteink ugyanúgy egyértelműen megmutatták, hogy az E2 indukálta ERK1/2 és CREB foszforiláció a GnRH neuronban történik, azonban a PKA és a CaMKII elhelyezkedését nem tudjuk pontosan meghatározni. Lehetnek preszinaptikusan a GABAerg terminálisokban vagy posztszinaptikusan a GnRH neuronokban. Érdekes módon a GnRH-ERβ egereken végzett kísérleteink azt mutatták, hogy az E2 indukálta CREB és ERK1/2 foszforiláció a GnRH-ban lévő ERβ-tól függ. Ez a megfigyelés azt igazolja, hogy az E2 az ERK1/2-n és a CREB-en megfigyelt nem-klasszikus hatását közvetlenül a GnRH neuronra hatva az ERβ-án keresztül fejti ki. A transzszinaptikus blokkolókkal kapott kísérleti adatainkkal egybevetve arra a következtetésre juthatunk, hogy az E2 jelátvivő rendszerekre gyakorolt hatása a GnRH neuronokban közvetlenül az ERβ-án keresztül és ezzel párhuzamosan közvetetten transzszinaptikusan is érvényesül. Ebben a modellben úgy képzeljük, hogy az ERK1/2 foszforiláció a GnRH neuronban egy koincidencia detektor, aminek aktiválásához mind a direkt ERβ-án keresztül megvalósuló E2 hatás, mind az indirekt E2 indukálta GABAerg szinaptikus transzmisszió jelenléte szükséges (33. ábra).

6.2.2.4. Az E2 indukálta CREB foszforiláció fiziológiásan releváns jelenség

Az E2 nem-klasszikus hatásainak vizsgálatában az egyik alapvető kérdés, hogy van-e fiziológiai relevanciája a jelenség meglétén túl. Kísérleteink azt mutatták, hogy a GnRH neuronokban a CREB és az ERK1/2 foszforiláció magasabb volt az áloperált diösztruszban lévő állatokban, mint az ovariektomizáltakban. Ez az eredmény azt sugallja, hogy az endogén, fiziológiásan a vérplazmában jelen lévő E2 modulálni tudja az ERK1/2-CREB jelátvivő hálózatot a GnRH neuronban. Az *in vitro* kísérleteket nagyrészt nM-os tartományban lévő E2 koncentrációkkal végzik (Lagrange és mtsai., 1995; Cornil és mtsai., 2006), ami szuprafiziológiás és nem tükrözi az élettani viszonyokat, mivel a keringésben lévő E2 koncentráció a pM-os tartományba esik (Butcher és mtsai., 1974). *In vitro* kísérleteinkben 100 pM E2 adása emelte a CREB foszforilációját a GnRH neuronokban, ami valószínűsíti, hogy ez a jelenség létrejöhet a központi idegrendszerben a keringésben lévő fiziológiás E2 szint hatására is.

Az itt bemutatott kísérletsorozatot nagyrészt ovariektomizált nőstény egereken végeztük és nagy dózisú egyszeri E2-vel kezeltük őket. Ez valójában egy E2 negatív visszacsatolásos modell is egyben, ami azt sugallja, hogy a nem-klasszikus folyamatok az ösztrogén GnRH neuronokra gyakorolt negatív visszacsatolásában is jelen vannak.

Korábbi kísérletek az ERα szerepét valószínűsítik az E2 visszacsatolásokban (Couse és mtsai., 1999; Wintermantel és mtsai., 2006; Glidewell-Kenney és mtsai., 2007), azonban a GnRH neuronok ERβ-t expresszálnak, ami azt jelentheti, hogy a nem-klasszikus folyamatok transzszinaptikus módon, az ERα-án keresztül vehetnek részt a GnRH visszacsatolásos szabályozásában. Az E2 indukálta nem-klasszikus folyamatok direkt és indirekt hatással rendelkeznek a GnRH neuronokon, ami az sugallhatja, hogy az E2 GnRH neuronra gyakorolt negatív visszacsatolásos mechanizmusaiban a közvetett és közvetlen hatásoknak egyaránt szerepe lehet.

Az ERK1/2-t és a CREB-et valamint a pERK1/2-t és a pCREB-et expresszáló GnRH neuronok száma alacsony, aminek egyrészt metodikai okai vannak, mivel az immunhisztokémia detekciós küszöbe miatt nem minden molekula tehető láthatóvá egy bizonyos expressziós szint alatt. A kapott adatok azt is mutatják, hogy nem minden GnRH neuron válaszol ugyanúgy az E2 alkalmazására. Ezt támasztja alá, hogy a pERK1/2-t és a pCREB-et expresszáló GnRH neuronok nagy részét az rPOA-ban találtuk az E2 kezelés után. Az rPOA-ban lévő GnRH neuron populáció az un. "surge" sejt csoport, ami kritikus szerepet játszhat a preovulatorikus gonadotropin "surge"-ben (Wintermantel és mtsai., 2006). Annak ellenére, hogy e neuron csoport szerepe a negatív visszacsatolásban nem ismert, kísérleteink megmutatták, hogy az ERK1/2 és a CREB foszforiláció tanulmányozása segítséget nyújthat a GnRH neuronok közötti funkcionális különbségek megtalálásában.

6.3. A CREB szerepe az ösztrogén indukálta negatív visszacsatolásban a GnRH neuronokon (3)

Az előző kísérletekből látható, hogy az E2 foszforilálja a CREB-et a GnRH neuronban. A következő kísérletsorozatban ennek a hatásnak a fiziológiai relevanciáját tanulmányoztuk. Ezért a kísérletekben GnRH-CREB KO, global-CREM KO és GnRH-CREB KO/global-CREM KO egerek alkalmazásával megvizsgáltuk az E2 negatív visszacsatolását a GnRH neuronokon.

6.3.1. Eredmények

6.3.1.1. A CREB GnRH neuron specifikus deléciója és a GnRH neuronok száma a GnRH-CREB és a CREM KO egerekben

A kettős jelöléses peroxidáz immunhisztokémiai vizsgálataink bebizonyították, hogy a CREB a kontroll állatokban (C57BL/6, CREB^{loxP/loxP} és CREM gént tartalmazó CREM^{+/+} egerek) és

a gobal-CREM KO egerekben a GnRH neuronok magjában mutatható ki. Ezzel ellentétben a GnRH-CREB KO és GnRH-CREB KO/global-CREM KO egerekben a CREB nem volt detektálható (34. ábra) a GnRH neuronokban, ami a Cre rekombináció nagyfokú hatékonyságát bizonyítja.

Megvizsgáltuk, GnRH a neuronokban a pCREB expresszióját az E2 adása után 3 órával. A kontroll állatokban és global-CREM KO a egerekben, a GnRH neuronok hozzávetőlegesen 25%-ában figyelhettünk meg pCREB immunreaktivítást az E2 adását követően. Ezzel ellentétben a **GnRH-CREB** KO és **GnRH-CREB** KO/global-CREM KO egerek GnRH kimutatható volt neuronjaiban nem pCREB expresszió.



34. ábra Az CREB expresszió a CREB mutáns egerekben. A A mikrofotó a CREB immunrektivitást (fekete mag piros nyíllal) mutatja a GnRH neuronban (barna citoplazma, sárga nyíllal) CREB^{loxP/loxP} egerekben. Kalibrációs egyenes 10µm. **B** A grafikon a CREB-et expresszáló GnRH neuronok %-os arányát mutatja kontroll (C57BL/6, CREB^{loxP/loxP}, CREM^{+/+}) és GnRH-CREB KO, global-CREM KO, GnRH-CREB KO/global-CREM KO egerekben. (***p<0,001) (ANOVA Tukey post hoc test)

dc_474_12

Egér vonal	MS	rPOA	АНА	Összes GnRH neuron száma
C57/BI6	6 ± 0.3	14 ± 0.6	3.3 ± 0.3	21.8 ± 1.4
CREB IOXP/IOXP	6.3 ± 0.3	12.6 ± 0.5	3.4 ± 0.4	21.7 ± 0.6
GnRH-CREB KO	6.9 ± 0.2	12.6 ± 0.4	3.3 ± 0.3	21.5 ± 0.9
CREM */+	5 ± 0.3	13.3 ± 0.4	3.5 ± 0.3	18.9 ± 1
global-CREM KO	6.1 ± 0.2	15.1 ± 0.6	4.3 ± 0.4	25.9 ± 0.6 **
GnRH-CREB KO/global-CREM KO	8 ± 0.4 *	15 ± 0.6	6.1 ± 0.2 *	28.9 ± 0.5 ***

Táblázat A táblázat mutatja az össz GnRH neuron számot és feltünteti az anatómiai régionkénti értékeket a vad tipusú és mutáns egyedekben (n=7-16, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001) (ANOVA Tukey post hoc test)

A korábbi vizsgálatok arról számoltak be, hogy a global-CREM KO és CREB KO egerekben nagymértékű sejtpusztulás volt megfigyelhető (Mantamadiotis és mtsai., 2002). Azért, hogy a GnRH neuronok túléléséről információt kapjunk felmértük e neuronok számát a kontroll és a mutáns állatokban. A mérések azt mutatták, hogy a GnRH-CREB KO és a kontroll állatokban a GnRH neuronok száma nem különbözött (Táblázat). Ezzel szemben szignifikánsan több GnRH neuront figyeltünk meg a global-CREM KO és a GnRH-CREB KO/global-CREM KO állatokban a kontroll CREB^{loxP/loxP} és CREM^{+/+} egerekéhez viszonyítva (Táblázat). Hasonlóan az előző kísérletekhez a GnRH neuronok száma anatómiai specificitást mutatott, mert a legtöbb GnRH neuront az rPOA-ban találtuk (Táblázat). A GnRH neuronok anatómiai eloszlása nem mutatott különbséget a kontroll és a mutáns állatok között.

6.3.1.2. A pubertás és az ösztrusz ciklus a CREB mutáns egerekben

A GnRH neuronok aktivációja szükséges a pubertás megjelenéséhez a nemi érés folyamán (Terasawa és Fernandez, 2001). A GnRH-CREB KO állatokban a pubertás megjelenését a vagina kinyílásának az időpontjával határoztuk meg. A vagina kinyílása a kontroll és a mutáns egerekben, ugyanabban az időpontban következett be (35. A ábra). Az ösztrus megjelenésének időpontja szintén nem mutatott eltéréseket a kontroll és a mutáns állatok között (36. B ábra).

Pubertás után a GnRH neuronok alapvető szerepet játszanak az ösztrusz ciklus szabályozásában. A ciklus váltakozását ezért a vaginális kenetek vizsgálatával



35. ábra A pubertás megjelenése CREB mutáns egerekben. A vagina kinyílásának időpontja és az első ösztrusz megjelenése KO és kontroll egerekben (n=8-14, *p<0,05) (ANOVA Tukey post

határoztuk meg három héten keresztül. Eredményeink azt mutatták, hogy a komplett ciklus hossza változó volt, de nem mutatott különbséget a kontroll és a mutáns egerek között (36. A,B ábra). A teljes ösztrusz ciklus hosszához képest viszont különböző időket töltöttek diösztruszban (34. C,B ábra) illetve ösztruszban. A GnRH-CREB KO és GnRH-CREB KO/global CREM KO állatok diösztruszban hosszabb de ösztruszban rövidebb időt töltöttek, mint a kontroll egerek (36. C,D ábra).



36. ábra Abnormális ösztrusz ciklus CREB mutáns egerekben. A-D A grafikonok a ciklusok számát (A) a ciklusok hosszát (B), az ösztrusz (C) illetve a diösztruszban (D) eltöltőtt napok számát mutatják. E Reprezentatív ösztrusz ciklus profil, amely mutatja (E: ösztrusz, P: proösztrusz, D:diösztrusz, M: metösztrusz) az ösztrusz ciklusban történt változásokat a CREB KO egerekben a kontrollhoz képest. (n=8-16, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001) (ANOVA Tukey post hoc test)

dc_474_12

6.3.1.3. CREB mutáns állatok termékenysége



37. ábra A CREB mutáns állatok termékenysége. A, B A grafikonok mutatják a kontroll és a mutáns nőstények átlag (+SEM) alomszámát (A) és az utódok számát almonként (B). C A grafikon mutatja a szülések között eltelt időt fiatal (Y) és öreg (O) egerekben mind a hat genotípusban. (n=4-6, **p<0,01; ***p<0,001) (ANOVA Tukey post hoc test)

Amiatt, hogy a megzavart ösztrusz ciklus mennyiben változtatja meg az egerek fertilitását megvizsgáltuk a termékenységet. Meghatároztuk az almok mennyiségét, az utódok számát almonként, és a szülések között eltelt időt. Az első hat hónapban nem találtunk különbségeket az összesen kihordott almok és az egy alomra jutott utódok számában (37. A,B ábra). A global-CREM KO állatok 50%-a infertilis volt, a fertilisek viszont normális mennyiségű alom- és utódszámot produkáltak. A születések közötti idő tekintetében szintén nem találtunk eltéréseket a kontroll és a mutáns egerek között.

Ellenben 6 hónap után a global-CREB KO állatok nem produkáltak több almot és a szülések között eltelt idő a duplájára nyúlt a GnRH-CREB KO és a GnRH-CREB KO/ global CREM KO egerekben (37. C ábra). 9 hónapos kor után a kontroll állatok fertilisek maradtak, azonban a GnRH-CREB KO és a GnRH-CREB KO/ global CREM KO egerek alom produkciója leállt (37. C ábra).

6.3.1.4. Negatív ösztrogén visszacsatolás CREB mutáns egerekben

Az ösztrogén GnRH neuronokon megvalósuló negatív visszacsatolása kritikus az ösztrusz ciklus és a termékenység fenntartásában. Azért, hogy a GnRH neuronra gyakorolt ösztrogén hatást meghatározzuk ösztrogén negatív visszacsatolási protokollt alkalmaztunk, melyben az LH hormont mértük alapállapotban, majd ovariektómia és 3 órával az E2 adása után.



38. ábra A GnRH specifikus CREB deléció hatása az ösztrogén negatív visszacsatolására. A A grafikon összesítve mutatja az LH szinteket az OVX előtt (intakt), egy héttel az OVX után és három órával az E2 adása után. Intakt állatok LH szérum szintjei (**B**) és az LH emlekedés (**C**) OVX után. **D**, OVX LH szintekhez normalizált LH szint csökkenés E2 kezelést követően (n=9-16, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001) (ANOVA Tukey post hoc test).

Az LH basalis értékei szignifikánsabban alacsonyabbak voltak a GnRH-CREB KO/ global CREM KO egerekben, mint a kontrollokban és a global-CREM KO egerekben (38. A, B ábra). Az ovariektómia négyszeres emelkedést produkált az LH szintben a GnRH CREB KO, global CREM KO és a kontroll egerekben (38. A,C ábra). Ezzel ellentétben az LH emelkedés mértéke a GnRH-CREB KO/ global CREM KO egerekben szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott (34. A,C ábra).

Az ösztrogén visszacsatolás protokoll végén alkalmazott E2 kezelés hatékonyan csökkentette az ovariektómia indukálta LH emelkedést C57BL/6, CREB^{loxP/loxP} és CREM^{+/+}, global-CREM KO, GnRH-CREB KO/ global CREM KO egerekben (38. A,D ábra). Az E2-indukálta LH csökkenés mértéke szignifikánsan alacsonyabbnak adódott a GnRH-CREB KO egerekben (38. A,D ábra) (a GnRH-CREB KO egerekben az E2 $36\pm13\%$ -os csökkenést okozott az LH szintben, ez $83 \pm 13\%$ -nak adódott a kontroll CREB^{loxP/loxP} egerekben).

6.3.1.4. A GnRH neuronok morfológiája CREB KO egerekben

Korábbi morfológiai kísérletek azt mutatták, hogy az E2 hatással van a GnRH neuron szómáján lévő szomaticus és dendrit tüskékre (Chan és mtsai., 2011). Ezért kísérleteinkben meghatároztuk a GnRH-CREB KO egerekben a somaticus tüskék számát. A GnRH neuronok fluorescens immunhisztokémiai és KLSM-mel történt analízise megmutatta, hogy a GnRH neuronok CREB deléciója a GnRH-CREB KO egerekben (112 GnRH neuron 5 egérből)



39. *ábra* Somaticus tüske denzitás a CREB KO egerek GnRH neuronjaiban. A-B A KLSM mikrofotók a CREB^{IOXP/IOXP} és a GnRH-CREB KO egerek fluorescens immunhisztokémiai jelöléssel készült GnRH neurojainak morfológiáját mutatják. A fehér négyszöggel körülhatárolt területek mutatják a tipikus somaticus tüskéket a GnRH neuronokban. A kalibrációs egyenes 5 μ m. C-E A grafikonok mutatják a tüske denzitást (C), a soma kerületet (D) és a tüskék számát sománként (E). (n=9-16, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001) (ANOVA Tukey post hoc test)

csökkentette a sejttesten lévő somaticus tüskék számát a CREB^{loxP/loxP} (129 GnRH neuron 6 egérből) egerekhez viszonyítva, az rPOA-ban (39. A-C,E ábra). Nem találtunk változást a GnRH neuronok sejttestének kerületi méreteiben a GnRH-CREB KO és a CREB^{loxP/loxP} egerek között (39. D ábra).

6.3.2. Következtetések

6.3.2.1. GnRH neuronok száma a CREB mutáns egerekben

A vizsgálatok igazolták, hogy sikeresen kiütöttük a GnRH neuronból a CREB-et, tehát a Cre rekombináció sikeresnek bizonyult a GnRH-CREB KO egerekben. Korábbi transzgenikus egereken történő vizsgálatok leírták, hogy a laterális septumban is találhatók GnRH neuronok (Skinner és mtsai., 2009), bár ez immunhisztokémiával nehezen igazolható. Elképzelhető, hogy a GnRH-CREB KO egerek lateralis septumában expresszálódó GnRH neuronokból is kiüthettük a CREB-et, azonban ezeknek a neuronoknak a fertilitásban betöltött szerepe bizonytalan.

Az egyik érdekes fenotípus a global CREM KO egereknél adódott, amelyekben valamivel megemelkedett a GnRH neuronok száma. Ezekben a vizsgálatokban nem eldönthető, hogy a növekedés a GnRH peptid koncentrációjának vagy a GnRH neuron számának tényleges emelkedése miatt következett be. Az emelkedés nem mutatott anatómiai specificitást a GnRH neuron anatómiai kontinumán (MS, rPOA, AHA), ezért feltehetőleg a változásért nem a GnRH neuron migrációjában bekövetkezett változások tehetők felelőssé (Jasoni és mtsai., 2009).

6.3.2.2 A pubertás, az ösztrusz ciklus és a termékenység a CREB mutáns egerekben

Az idegrendszerben a CREB-ről köztudott, hogy rengeteg folyamatban játszik kulcsszerepet, kezdve a sejtek túlélésének szabályozásától egészen a memória folyamatokig (Silva és mtsai., 1998; Finkbeiner, 2000; Mantamadiotis és mtsai., 2002). Érdekes módon azonban a GnRH neuronok embrionális kortól való CREB deléciója relatíve kis hatással rendelkezik. Ugyan megfigyelhető valamekkora deficit a reproduktív funkciókban, de a GnRH neuronok GnRH peptid szintetizáló képessége fennmarad és az állatok fiatal korban fertilisek. Korábbi vizsgálatok azt is megmutatták, hogy a GnRH neuronok legalább 65%-át kell ahhoz kiírtani, hogy a fertilitás csökkenjen (Herbison és mtsai., 2008). Ezek szerint, kísérleteinkben a GnRH neuronok legalább 35 %-a megfelelően működik a CREB/CREM mutáns egerekben.

A CREB és/vagy a CREM deléciója a GnRH neruonokban nem változtatta meg a pubertás időzítését. Azonban felnőtt korban a GnRH-CREB KO egerekben (CREM delécióval vagy anélkül) az ösztrusz ciklus dinamikája megváltozott és hosszabb időt töltött diösztruszban és rövidebbet ösztruszban az állat. Érdekes módon ez a megzavart ösztrusz ciklus és negatív visszacsatolás nem volt hatással az egerek termékenységére az első hat hónapban a mutáns egerekben, ami arra utal, hogy a GnRH-CREB KO egerek ovulációja nem érintett. Mindöszze az történhettet, hogy a megváltozott GnRH/LH kimenet megzavarhatta az ösztrusz ciklus integritását a mutáns egerekben. A 6. hónap után azonban a GnRH-CREB KO egerek (CREM delécióval vagy anélkül) nem produkáltak több utódot, ami arra enged következtetni, hogy a GnRH neuronokban a CREB deléciója felgyorsítja a reprodukciós öregedést. Számos tanulmány említette a GnRH neuronok funkcióinak csökkenését az öregedés előrehaladtával (Nass és mtsai., 1984; Lu és mtsai., 1985; Gore és mtsai., 2000). Megjegyzendő, hogy a GnRH neuronok szerepe a reprodukciós öregedésben rágcsálókban jóval fontosabb, mint emberben (Hall és mtsai., 2000; Gill és mtsai., 2002; Kermath és Gore, 2012).

6.3.2.3. Negatív ösztrogén visszacsatolás CREB mutáns egerekben

A jelenlegi eredményeink azt mutatják, hogy a CREB-nek fontos szerepe van a GnRH neuron fiziológiás működésében. Korábbi kísérletünk, ahol megmutattuk, hogy az E2 gyorsan foszforilálja a CREB-et a GnRH neuronban ovariektomizált állatban, azt sugallta, hogy a gyors hatásnak lehet valamilyen szerepe az E2 negatív visszacsatolásában. Az itt bemutatott negatív visszacsatolásos kísérletek alátámasztották azt a feltevésünket, hogy a GnRH-CREB KO egerekben az E2 nem tudta az ovariektómia indukálta LH emelkedést visszaszorítani. Ezek alapján arra a következtetésre juthatunk, hogy a CREB fontos szerepet játszik a GnRH neuronok akut ösztrogén visszacsatolásában. Az is valószínűsíthető, hogy a CREM képes kompenzálni a CREB veszteséget az ovariektómia indukálta LH emelkedésben, mivel ez az emelkedés jelentősen kisebb volt a GnRH-CREB KO/global CREM KO egerekben, mint a GnRH-CREB KO egerekben. Látható még, hogy a CREB-en kívül más jelátvivő rendszer is szerepet játszhat a negatív visszacsatolás szabályozásában. Ezt az a megfigyelésünk támasztja alá, hogy a bazális LH szint és az ovariektómia indukálta LH emelkedés is normális tartományban volt a GnRH-CREB KO állatokban, ami a CREB mellett működő jelátvivő rendszer meglétét valószínűsíti ezekben a folyamatokban.

6.3.2.4. A GnRH neuronok morfológiája CREB KO egerekben

Az előző kísérletek azt mutatták, hogy a CREB fontos szerepet játszik az E2 indukálta dendritikus átrendeződésekben és a somaticus tüske kialakulásában a hippocampusban (Murphy és Segal, 1997; Segal és Murphy, 2001). Mivel az E2-ről ismert, hogy szabályozza a GnRH neuron somaticus és dendrit tüskéinek denzitását (Chan és mtsai., 2011), megvizsgáltuk, hogy a GnRH neuron CREB deléciója, hogyan hat a somaticus tüskék morfológiájára. A KLSM-en történt vizsgálatok a somaticus tüske szám 50%-os csökkenését mutatták a GnRH-CREB KO állatok GnRH neuronjaiban. Ez a megfigyelés azt jelenti, hogy a somaticus tüskék számának a csökkenése valószínüleg csökkenti az efferens bemenetek számát, mely a negatív visszacsatolás defektusához vezethet a GnRH neuronban.

6.4. Nem-klasszikus ösztrogén hatások a basalis előagyi kolinerg neuronokban (4,17)

Következő vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy az E2 milyen nem-klasszikus hatásokkal rendelkezik egy-sejt szinten a memória valamint a kognitív folyamatokban központi szerepet játszó kolinerg BEK neuronokon. Vizsgálatainkat vad típusú, ChAT-GFP és nERα KO egereken végeztük. Kísérleteinkben immunhisztokémiát, konfokális pásztázó lézer mikroszkópiát technológiát és élő sejten megvalósuló egy-molekula detekciós valós idejű mikroszkópiát alkalmaztunk.

6.4.1. Eredmények

6.4.1.1. Egy-molekula detekciós mérések a BEK neuronok TrkA receptorain

A neutrophin jelátvivő rendszerek kezdő pontja a kolinerg neuronokban a TrkA receptor



40. ábra Az E2 TrkA receptorra gyakorolt hatásának egy-molekula detekciós analízise felnőtt egérből származó kolinerg neuronban. A-C Tipikus a TrkA receptor mozgásának trajektóriája a kolinerg neuron membránjában. A színek (A) időben mutatják a receptor helyét az adott trajektóriában. A sárga színnel körülhatárolt piros területek (B) mutatják a TrkA receptor immobilizációs helyeit a trajektóriában. A nagyobb nagyítású képen (C) jól látszanak az immobil szakaszok részletei a trajektóriában. D A grafikon egy TrkA molekula immobilis (IP) szkaszainak hossz változásait mutatja az időben 100 pM E2 adása után.
(Sobreviela és mtsai., 1994). Ezért ezekben a kísérletekben megvizsgáltuk, hogy az E2, hogy befolyásolja a TrkA receptor mozgását felnőtt kolinerg neuronban. A TrkA receptor tranziens immobilizációra képes a sejtmembránban, ami a receptor aktivációját jelzi (Shibata és mtsai., 2006). Kísérleteinkben megfigyeltük, hogy a TrkA receptorok membránfelszíni mozgásában immobilis és mobilis szakaszok váltják egymást felnőtt izolált kolinerg neuronokban (40. ábra A,B,C). 100nM NGF adása a TrkA receptorok 1 percre jutó immobilizációinak számát (N_i) nem, de a immobilizációval percenként eltöltött idejét (%T_i) jelentősen megnövelte (NGF kezelés előtt: %T_i:39,9±3,3%, NGF kezelés alatt: %T_i:47,8±1,3%, p<0,05; NGF kezelés előtt: N_i:41,8±3,1, NGF kezelés alatt: N_i: 38,5±4,2). Az NGF kezeléshez hasonlóan 100 pM E2 szignifikánsan növelte a %T_i-t az N_i változatlanul hagyása mellett (E2 kezelés előtt: %T_i:32±6,3%, E2 kezelés alatt: %T_i:43±4,3%, p<0,05; E2 kezelés előtt: N_i:46,8±6,7, E2 kezelés alatt: N_i: 56,1±13,4).

6.4.1.2. Az E2 hatása a CREB foszforilációra a BEK neuronokon

Α neutrophin szignalizáció egyik végpontjában **CREB** a transzkripciós faktor (Shaywitz található és Greenberg, 1999). Ezért ezekben az immunperoxidáz hisztokémiát alkalmazó vizsgálatainkban 33ng/g E2 adása után 15 perccel, 1 órával és 4 órával meghatároztuk a CREB foszforiláció mértékét a BEK neuronokban ovariektomizált egerekben.



41. ábra Az E2 gyorsan idő függően foszforilálja a CREB-et a kolinerg neuronokban in vivo. A mikrofotó (A) mutatja a nukleárisan elhelyezkedő CREB (fekete) immunreaktivitást a ChAT pozitív neuronban (barna). A kalibrációs egyenes 10µm. A grafikonok a pCREB-et expresszáló kolinerg neuronok %-os arányát (% of ChAT ir) mutatják 15 perccel, 1 órával, 4 órával a vivőanyag illetve az E2 beadása után az MS-ben (A), az SI -ben (SI/NBM-ben) (B) és a caudatum putamenben (STR) (C) (n=5-8, *p<0,05).

A CREB és a pCREB immunreaktivitást a BEK neuronok magjában mutattuk ki (41. A ábra). Kvantitatív vizsgálataink megmutatták, hogy E2 adása után 15 percen belül az MSben található pCREB immunreaktivitással rendelkező kolineg neuronok száma szignifikánsan megemelkedett, majd 1 óra múlva érte el a csúcsát (41. B ábra). Az SI/NBM-ben az E2

indukálta CREB foszforiláció 15 percen belül szignifikánsan megnövekedett, de 1 óra múlva az érték visszaesett az alapszintre. Az E2-nek nem volt hatása a caudatum-putamenben lévő kolinerg neuronok pCREB expressziójára. A BEK kolinerg neuronok CREB immunreaktivitását az E2 nem befolyásolta egyik anatómiai területen és egyik időpontban sem. A BEK neuronok száma nem változott az E2 kezelést követően.

6.4.1.3. Az ösztrogén receptorok szerepe az E2 indukálta CREB foszforilációra a BEK neuronokban

Azért, hogy meghatározzuk az ösztrogén receptorok szerepét, ERαKO, ERβKO és vad típusú egereken is elvégeztük kísérleteinket. Az E2-indukálta CREB foszforilációt a kezelés után 15 perc múlva határoztuk meg, mely időpontban előzőleg mind az SI-ben, mind az MS-ben lévő kolinerg neuronok CREB foszforilációja szignifikánsan magas volt. A C57BL/6 egereken elvégzett kísérletek eredményéhez hasonlóan az E2 kezelés szignifikánsan megnövelte a

foszforiláció CREB mértékét a vad típusú egereknél az SI/NBMben és az MS-ben lévő kolinerg neuronokban, de a caudatumputamenben változatlanul hagyta (42. A-C ábra). Az MS-ben lévő kolinerg neuronokban lévő CREB foszforiláció alapszintje csökkent a vad típushoz képest, de az E2 hatására a CREB foszforiláció



42. *ábra* ERa kell az E2 indukálta CREB foszforilációhoz kolinerg neuronban in vivo. A grafikonok a pCREB-et expresszáló kolinerg neuronok %-os arányát (% of ChAT ir) mutatják vad típusú (VT), ERaKO és ER β KO egerekben E2 beadása után 15 perccel az MS-ben (A), az SI –ben (SI/NBM-ben) (B) és a caudatum putamenben (STR) (C) (n=5-8, *p<0,05).

emelkedett értéket mutatott az ERβ KO egereknél az MS-ben és az SI/NBM-ben (42. A ábra). Ezzel ellentétben az E2 nem volt képes emelni a pCREB immunreaktív kolinerg neuronok számát sem az MS-ben sem pedig az SI/NBM-ben az ERαKO egerekben (42. A,D ábra). A vivőanyaggal kezelt egerekben a BEK neuronok CREB expressziója nem mutatott különbséget a vad típusú, az ERαKO és az ERβKO egerek között egyik anatómiai területen

sem (42. A-C ábra). Az E2 kezelés nem volt hatással a BEK neuronok CREB szintjére és a kolinerg neuronok számára.

6.4.1.4. Az E2-indukálta CREB foszforiláció TTX érzékenységének vizsgálata in vitro



43. *ábra* Túlélő agyszeleten az E2 közvetlenül foszforilálja a CREB-et a kolinerg neuronban. A mikrofotó (A) mutatja a nukleárisan elhelyezkedő CREB (fekete) immunreaktivitását a ChAT pozitív neuronban (barna). A kalibrációs egyenes 10µm. A grafikonok a pCREB-et expresszáló kolinerg neuronok %-os arányát (% of ChAT ir) mutatják ACSF és TTX jelenlétében E2 beadása után 15 perccel az MS-ben (A), az SI -ben (SI/NBM-ben) (B) és a caudatum putamenben (STR) (C) (n=6-8, (**p<0,05).

А következő kísérletben meghatároztuk, hogy CREB а foszforiláció emelkedése mennyiben tekinthető az E2 kolinerg neuronra gyakorolt direkt hatásának. Ezért a kísérletekhez korábbi hasonlóan, túlélő agyszeleteket használtunk, melyeket TTX-el kezeltünk és 15 elteltével perc kettős jelöléses immunperoxidáz hisztokémia segítségével megvizsgáltuk a CREB foszforiláció mértékét. А túlélő agyszeletben lévő kolinerg neuronok száma és CREB immunreaktivitása

hasonló volt az *in vivo* kísérleteknél tapasztaltakhoz (43. A ábra). A túlélő agyszeletben lévő BEK neuron bazális pCREB szintje magasabb volt valamivel, mint az in vivo mért bazális értékek. Azonban az E2 alkalmazása után 15 percen belül szignifikánsan megemelkedett a pCREB-et expresszáló kolinerg neuronok száma az MS-ben és az SI/NBM-ben (43. B-C ábra). A TTX alkalmazása nem volt hatással az E2 kiváltotta CREB foszforilációra a kolinerg neuronokban ezeken az anatómiai területeken. A CREB-et expresszáló kolinerg neuronok számát nem befolyásolta sem az E2 sem pedig a TTX kezelés.

6.4.1.5. Az E2 indukálta CREB foszforilációban résztvevő jelátvivő útvonalak

Tovább vizsgálva a CREB foszforiláció mechanizmusát meghatároztuk a PKA és a MAPK jelátviteli útvonalak szerepét az E2 kiváltotta CREB foszforilációban a BEK neuronokban. Ezekben a kísérletekben az állatok agyának oldalkamrájába H-89 PKA inhibitort vagy U0126 MEK inhibitort adtunk 30 perccel az E2 adását megelőzően. A CREB foszforiláció kifejeződésének mértékét az E2 adását követően 15 percen belül vizsgáltuk. Az E2 a caudatum-putamenben nem, de az MS-ben és az SI/NBM-ben lévő kolinerg neuronokban emelte a CREB foszforilációt, azokban az állatokban, amelyek előzőleg az oldalkamrájukba a jelátviteli molekula inhibitorok vivőanyagát (DMSO) kapták (44,45. ábra). Az intercerebroventrikulárisan adott H-89 az MS-ben nem, de az SI/NBM-ben blokkolta az E2 indukálta CREB foszforilációt (44. ábra). Az oldalkamrába adott U0126 ezzel ellentétben mind az SI/NBM-ben mind pedig az MS-ben gátolta az E2-nek a CREB foszforilációra gyakorolt hatását (45. ábra), a caudatum-putamenben viszont egyik kezelés sem okozott változást (44, 45. ábra). A BEK neuronok CREB expressziójának mértéke nem változott egyik kísérletben sem.



44. ábra Az E2 indukálta CREB foszforiláció PKA dependenciája a kolinerg neuronban. A grafikonok a pCREB-et expresszáló kolinerg neuronok %-os arányát (% of ChAT ir) mutatják intracerebroventriculárisan adott DMSO illetve PKA inhibitor H-89 jelenlétében E2 beadása után 15 perccel az MS-ben (**A**), az SI-ben (SI/NBM-ben) (**B**) és a caudatum putamenben (STR) (**C**) (n=6-8, (**p<0,05)).



45. ábra Az E2 indukálta CREB foszforilációja az ERK1/2 aktivációjától függ a kolinerg neuronban. A grafikonok a pCREB-et expresszáló kolinerg neuronok %-os arányát (% of ChAT ir) mutatják intracerebroventriculárisan adott DMSO illetve MEK inhibitor U0126 jelenlétében E2 beadása után 15 perccel az MS-ben (A), az SI-ben (SI/NBM-ben) (**B**) és a caudatum-putamenben (STR) (**C**) (n=6-8, (**p<0,05)).

6.4.1.6. Az intakt versus ovariektomizált állatok E2 indukálta CREB foszforilációjának összehasonlítása

GnRH Hasonlóan a neuronokhoz a következő lépésben A 30 TDCREB megvizsgáltuk, hogy az endogénen termelődő E2 hogyan befolyásolja BEK neuronok CREB a foszforilációját. Ezért ezekben a kísérletekben összehasonlítottuk az ovariektomizált és az áloperált proösztruszban lévő nőstény egerek BEK neuronjainak pCREB Méréseink expresszióját. azt mutatták, hogy proösztruszban a kifejező pCREB-et kolinerg neuronok száma, az SI-ben és az



46. *ábra* A CREB foszforilációja emelkedett szintet mutat a proösztruszban lévő egér kolinerg neuronjában az OVX kontrollhoz képest. A grafikonok a pCREB-et (A) és a CREB-et expresszáló (B) kolinerg neuronok %-os arányát (% of ChAT ir) valamint a ChAT immunreaktív (ir) neuronok számát mutatják az MS-ben, az SI-ben (SI/NBM-ben) és a caudatum-putamenben (STR) (n=5-6, (**p<0.01)).

MS-ben szignifikánsan magasabb volt, mint az ovariektomizált állatokban (46. A ábra). A caudatum-putamen területén nem figyeltünk meg változást (46. A ábra). A kolinerg neuronok számát és CREB expresszióját nem befolyásolta az ovariektómia (46. B,C ábra).

6.4.2. Következtetések

A szervezet sok sejtjében leírták az ösztrogén gyors nem-klasszikus hatásait, azonban jelenlegi kísérleteink először mutattak rá arra, hogy az E2 képes a kolinerg neuronban nem-klasszikus hatásokat kiváltani. Megjegyzendő egyrészt, hogy az egy-molekula detekciós méréseink egyértelműen mutatják az E2 hatásának nem-klasszikus jellegét. Másrészt az ösztrogén hatások CREB foszforilációt kiváltó folyamatának gyorsasága (<15 perc) önmagában elegendő bizonyíték a folyamat nem-klasszikus voltának bizonyítására, mivel korábbi tanulmányok megerősítették, hogy a géntranszkripció illetve a protein szintézis gátlása hatástalannak bizonyult a CREB foszforiláció ilyen rövid idő alatt bekövetkező foszforilációjában (Falkenstein és mtsai., 2000).

6.4.2.1. Egy-molekula detekciós mérések élő BEK neuronok neutrofin receptorain

A TrkA receptorok alapvető szerepet játszanak a kolinerg neuronok funkcióinak szabályozásában és aktiválják az ERK1/2/CREB szignáltranszdukciós rendszert (Shaywitz és Greenberg, 1999; Niewiadomska és mtsai., 2011) . Korábbi PC12-es sejteken végzett egymolekula detekciós vizsgálatok kimutatták, hogy a TrkA receptorok immobilis szakaszaiban történik meg a receptorok foszforilációja és a Ras/Raf interakció (Shibata és mtsai., 2006), ami aktiválja a receptorokhoz kapcsolt jelátvivő útvonalakat, mint a MAPK rendszert (Shaywitz és Greenberg, 1999). Kísérleti eredményeink megmutatták, hogy az E2 a TrkA receptor ligandjához az NGF-hez hasonlóan növeli a TrkA receptor molekula immobilizációval eltöltött idejét. Mivel a TrkA receptor aktivációja az immobilis szakaszban következik be (Shibata és mtsai., 2006), ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a TrkA receptor az E2 hatására a kolinerg neuron memránjában aktiválódik. Ennek a jelenségnek fontos szerepe lehet a kolinerg neuronok szignáltranszdukciós működésének szabályozásában is.

6.4.2.2. Az E2 közvetlenül foszforilálja a CREB-et a BEK neuronokban

A központi idegrendszerben a CREB mind transzszinaptikusan, mind pedig direkten az adott sejtre ható folyamatok révén foszforilálódhat (Matthies és mtsai., 1997; Lee és mtsai., 2005). Kísérleteink azt valószínűsítik, hogy az E2 közvetlenül foszforilálja a CREB-et a BEK neuronokban, mivel a TTX alkalmazása hatástalannak bizonyult. Ugyanakkor megemlítendő, hogy ebben az esetben nem gátoltuk az akciós potenciál független neurotranszmissziót, mely jelentős szerepet játszik a GnRH neuronokkal szinaptikus kapcsolatot létesítő GABA neuronoknál.

6.4.2.3. A CREB foszforiláció dinamikája

Az E2-indukálta CREB foszforilációt az idegrendszerben sok területen leírták (Gu és mtsai., 1996; Zhou és mtsai., 1996; Purves-Tyson és Keast, 2004), azonban kevés figyelmet szenteltek a folyamat idegsejt specifikus jellegének kimutatására. Korábbi kísérleteinkben megmutattuk, hogy az E2 képes a GnRH neuronokban az ERβ-án keresztül foszforilálni a CREB-et és most igazoltuk, hogy az E2 ugyenezt tudja a BEK neuronokban is az ERα közvetítésével. A GnRH neuronokban és a kolinerg neuronokban megfigyelt E2 indukálta CREB foszforiláció dinamikájában azonban alapvető különbségek vannak. A GnRH

neuronokban a CREB foszforiláció emelkedett marad az E2 adását követő 4 óra múlva. Ezzel szemben a BEK neuronokban ez a folyamat tranziens volt és 15 percnél illetve 1 óránál mutatott maximumot. Ez a differencia jelzi azt a nyilvánvaló különbséget, ami az E2 szenzitív jelátvivő útvonalban van a két neuronális fenotípus között. A különbség abból fakadhat, hogy a GnRH neuronok ER β -t (Hrabovszky és mtsai., 2000), a BEK neuronok ER α -t expresszálnak (Shughrue és mtsai., 2000). Ezt mutatja az is, hogy a BEK neuronokban az E2 indukálta CREB foszforiláció blokkolódik az ER α KO egerekben, vagyis az E2 kiváltotta CREB foszforiláció taz ER α közvetíti a BEK neuronokban. Érdekes megfigyelés, hogy az E2 indukálta CREB foszforiláció nem volt annyira intenzív az ER β KO állatokban a septalis területen, ami azt is jelentheti, hogy az ER β -nak lehet valamilyen szerepe az MS-ben lejátszódó CREB foszforilációban. Ez azonban nem von le abból az egyértelmű következtetésből, hogy *in vivo* az E2 indukálta CREB foszforiláció a BEK neuronokban az ER α -án keresztül valósul meg.

6.4.2.3. A CREB foszforiláció anatómiai specificitása, a jelátvivő pályák szerepe a BEK neuronokban

Kísérleteinkben a BEK neuronok CREB foszforilációjának dinamikája nem csak a GnRH neuronoktól különbözött, hanem anatómiai specificitást is mutatott. Az MS-ben a CREB foszforiláció maximuma 1 óránál, az SI/NBM-ben ugyanez 15 percnél volt megfigyelhető. Ez arra enged következtetni, hogy a kolinerg neuronok E2 szenzitív szignalizációja a kolinerg neuronok elhelyezkedésétől függ. Kimutattuk, hogy míg a CREB foszforiláció PKA inhibitorral való blokkolása csak az SI/NBM-ben volt hatékony addig az ERK1/2 gátlása az SI/NBM-ben és az MS-ben is hatékonynak bizonyult. Mivel a PKA aktiválni tudja a MAPK jelátviteli útvonalat ezért ezek az eredmények azt jelenthetik, hogy az E2 a CREB-et az SI/NBM-ben a PKA-ERK1/2 jelátviteli rendszeren keresztül foszforilálja, az MS-ben pedig ugyanehhez csak az ERK1/2 aktiválása kell.

6.4.2.4. Az E2 indukálta CREB foszforiláció fiziológiás szerepe a BEK neuronban

Az alapvető kérdés az, hogy mennyire relevánsak ezek az adatok a kolinerg neuronok mőködését tekintve. Az a tény, hogy a pCREB immureaktivitással rendelkező BEK neuronok száma a proösztruszban lévő állatokban magasabb értékeket mutatott, mint az ovariektomizáltakban, azt jelenti, hogy a vérben lévő, az ováriumokban termelődő E2 befolyásolhatja, a GnRH neuronokhoz hasonlóan, a BEK neuronokban is a CREB foszforilációt.

Az adatok egyik legfontosabb fiziológiai relevanciája az E2 jól ismert citoprotektív hatásaival hozható összefüggésbe. A CREB egy központi jelentőségű transzkripciós faktor a neuroprotektív folyamatokban (Finkbeiner és mtsai., 1997; Walton és Dragunow, 2000). Számos antiapoptotikus protein pl. a Bcl2, a Bclx és a neuropeptid, mint a BDNF génje tartalmaz CRE-t a promoter régiójában (Tao és mtsai., 1998; Pugazhenthi és mtsai., 2000; Saini és mtsai., 2004), ami jól mutatja a CREB központi jelentőségét az idegsejtek túlélésének szabályozásában. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy az E2 indukálta CREB foszforilációnak jelentős szerepe lehet az E2-nek a BEK neuronokra gyakorolt protektív hatásaiban. Azonban további kísérletek szükségesek ahhoz, hogy az E2 indukálta nem-klasszikus folyamatok szerepét tisztázzuk a neuroprotektív folyamatokban, a BEK-ben.

6.5. A nem-klasszikus ösztrogén hatások szerepe az ösztrogén indukálta neuroprotekcióban a bazális kolinerg neuronokon in vivo (1, 4, 5, 8, 15, 16)

Ezekben a kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy az E2 indukálta nem-klasszikus folyamatok hogyan hatnak a neurodegeneratív folyamatokra. Megvizsgáltuk, egyszeri E2 injekció hatását a BEK neuronok neurodegenerációjára. Intracerebrális NMDA injekcióval irtottuk a BEK neuronokat ovariektomizált nőstény egerekben. Az E2-t az NMDA injekció után 1órával adtuk be.

6.5.1. Eredmények

6.5.1.1. Az NMDA hatása a BEK neuronokra

Az állatok unilaterálisan NMDA injekciót kaptak az SI/NBM komplex-be, amely jelentős csökkenést okozott ipsilaterálisan az AChE pozitív rostok denzitásában a cortex nagy részében és a ChAT immunreaktív sejtek számában az SI/NBM-ben (47. A-F ábra). A kolinerg rostok kérgi pusztulása jó egyezést mutatott az SI/NBM-ből unilaterálisan eredő kolinerg projekciók anatómiai elhelyezkedésével (Luiten és mtsai., 1985). Kísérleteinkben a legnagyobb kolinerg rostkiesést az elsődleges és a másodlagos szomatoszenzoros cortex (S1, S2) IV. és V. rétegében tapasztaltuk (47. C-F ábra), ami az SI/NBM komplex kortikalis projekciós neuronjainak a célterülete (Zaborszky és mtsai., 1999). A kolinerg rostpusztulás mértéke nem volt lineáris összefüggésben a 10 mM-os NMDA beadástól eltelt idővel, mert a 12. napra érte el a maximumát (40-50%), és ezután a pusztulás mértéke nem változott tovább (47. G ábra). A ChAT immunoreaktív sejtek NMDA-indukálta pusztulása hasonló időlefutást mutatott, ami ugyancsak a 12. napra érte el a maximumát (80-85%). Ennek megfelelően 12 napos túlélési időt választottunk, vagyis az NMDA injekció után 12 nappal vizsgáltuk a kolinerg rostkiesést és a ChAT immunreaktív sejtek csökkenésének a mértékét. A TBS-sel injekciózott kontroll állatokban nem tapasztaltunk kolinerg sejttest illetve kolinerg rostpusztulást. Az 1, 10, 20 mM-os NMDA alkalmazása dózisfüggő kolinerg rostkiesést eredményezett a szomatoszenzoros cortexben (47. H ábra). 10 mM NMDA 50%-os rostkiesést okozott, ami kedvező alapot szolgáltat ahhoz, hogy a defektust egyaránt lehessen lefelé illetve felfelé befolyásolni, ezért a továbbiakban ezt az NMDA dózist alkalmaztuk.

dc_474_12



47. *ábra* Az SI/NBM-be adott NMDA injekció hatása a kolinerg rostokra és sejttestekre. A A 10 nM-os NMDA léziójának helyét mutatják a sematikus koronális agy metszetek. A lézió kiterjedése állatonként látható (kölönböző mintázatú terültek jelölik) (n=6). B A sematikus ábra mutatja a kolinerg pusztulás neuroanatómiai helyét a kontralaterális S1/S2 szomatoszenzoros cortexben és az SI/NBM-ben NMDA adása után (a fekete nyíl jelzi az injekció helyét). C-F A mikrofotók a ChAT immunreaktív sejttesteket mutatják az SI/NBM-ben és az AchE pozitív rostokat a szomatoszenzoros kéreg IV. és V. rétegében a kontralaterális (C,E) és az ipsilaterális oldalon (D,F) 12 nappal az SI/NBM-be adott NMDA injekciót követően (kalibrációs egyenes 100µm, kis kép 25 µm (D) és 50 µm (F)), fehér vonalak jelzik a réteg határokat). G Az NMDA injektált oldal AChE tartalmú (kolinerg) rost redukcióját a kontroll oldal százalékában fejeztük ki. A garafikon a kolinerg rost veszteséget mutatja különböző időpontokban az NMDA injekció után. A nem-lineáris regressziós illesztési függvény Y =(plató+ 23,1)(1-exp(0,3x)) adódott, ahol a plató 42,4%. H A grafikon mutatja a különböző koncentrációjú NMDA injekciók hatását a kolinerg rostpusztulásra 12 nappal az injekció után. A kontroll injekció TBS volt (n=5-6, **p<0.01, ***p<0.001).



48. ábra Az E2 hatása az NMDA indukálta kolinerg rostpusztulásra. A-B A mikrofotók az NMDA injekció után 1 órával adott E2 hátását mutatják az AchE pozitív rostokra a szomatoszenzoros kéreg IV. és V. rétegében a kontralaterális (A) és az ipsilaterális oldalon (B) (kalibrációs egyenes: 50 μ m, fehér vonalak jelzik a réteg határokat). C-D Az NMDA injektált oldal AChE tartalmú (kolinerg) rost redukcióját a kontroll oldal százalékában fejeztük ki. C A grafikon az 1 és 24 órával az NMDA injekció után adott vivőanyag (V) illetve E2 hatását mutatja a kolinerg rostveszteségre. D A grafikon különbőző E2 dózis hatását mutatja a kolinerg rostveszteségre (n=5-8, **p<0,01).

6.5.1.2. Az E2 hatása a kéreg kolinerg rostdenzitására és a kolinerg sejttestek számára az SI/NBM-ben

A kísérleteinkben alkalmazott 3,3 és 33 ng/g E2 hasonlóan az előző vizsgálatainkhoz szuprafiziológiás E2 koncentrációváltozást okozott az állatok vérplazmájában, ami 24-óra elteltével tért vissza az alapértékre. Az E2-t az NMDA injekció után 1 órával adtuk és ez szignifikánsan csökkentette az NMDA indukálta kolinerg rostkiesés mértékét a kéregben (48. A-C ábra). Az NMDA injekció után 24 órával adott E2 viszont nem volt hatással a kolinerg rostpusztulásra. Az E2 dózisfüggő módon csökkentette a kolinerg rostpusztulás mértékét (3,3 ng/g E2 hatása nem volt szignifikáns) (48. D ábra). A 33 ng E2 nem okozott változást a ChAT pozitív sejtek NMDA indukálta pusztulásában az SI/NBM-ben. Az E2 kezelés nem változtatta meg a kolinerg rostdenzitás mértékét a kontralaterális szomatoszenzoros kéregben 49. D ábra).



49. ábra Az E2 hatása az NMDA indukálta kolinerg sejtpusztulásra. **A-B** A mikrofotók az NMDA injekció után 1 órával adott E2 hatását mutatják a ChAT pozitív neuronokon az SI-ben és az NBM-ben a kontralaterális (A) és az ipsilaterális oldalon (B) (kalibrációs egyenes: 100 μ m). **C** Az NMDA injektált oldal ChAT tartalmú (kolinerg) sejt redukcióját a kontroll oldal százalékában fejeztük ki. A grafikon a vivőanyag (V) és az E2 hatását mutatja a kolinerg sejt veszteségre. (n=7).

6.5.1.3. Az ERa szerepe az E2 protektív hatásában a BEK neuronokon

Ezekben a vizsgálatokban meghatároztuk az ER α szerepét az E2 indukálta protektív hatásokban. Kísérleteinkben nER α KO egereket használtunk, amelyekben a basalis előagyi neuronokból hiányzik az ER α . Fluorescens immunhisztokémiai módszerekkel validáltuk az ER α hiányát a BEK neuronokban (50. A,B ábra). Az E2 kezelés nem volt hatással az NMDA indukálta kolinerg rostpusztulásra nER α KO egerekben (50. C ábra). Ezzel ellentétben az E2



50. ábra Az E2 hatása az NMDA indukálta kolinerg sejtpusztulásra nERa KO egerekben. A-B A mikrofotók az ERa fluorescens immunreaktivitását (piros) mutatják a kolinerg neuronokban (zöld) az NBM-ben vad típusú (A) és nERa KO egerekben (B) (kalibrációs egyenes: 100 μ m). C Az NMDA injektált oldal AChE tartalmú (kolinerg) rost redukcióját a kontroll oldal százalékában fejeztük ki. A grafikon a vivőanyag (V) és az E2 hatását mutatja a kolinerg sejt veszteségre vad típusú (VT) és nERa KO egerekben (n=7).

protektív volt az NMDA hatással szemben az nERαKO állatok vad fenotípusában (normál ERα expresszióval rendelkező egerekben (50. C ábra).

6.5.1.4. A nem-klasszikus E2 jelátvivő rendszer aktivációjának hatása az NMDA indukálta kolinerg rostpusztulásra

Ezekben a vizsgálatokban egy nem-klasszikus jelátviteli aktivátort, az ösztrént (4-estren- 3α , 17 β -diol) alkalmaztuk. Az ösztrén jól ismert nem-klasszikus hatásairól, mivel bizonyos

dc_474_12

koncentráció tartomány alatt (<300 µg/30g) nem aktiválja az ERE mediálta transzkripciót (Kousteni és mtsai., 2001; Hewitt és mtsai., 2006; Wessler és mtsai., 2006). Az ösztrén alkalmazása 1 órával az NMDA injekció után dózisfüggő módon csökkentette a kolinerg rostpusztulás mértékét a szomatoszenzoros kéregben (51. ábra).



51. ábra Az ösztrén hatása az NMDA indukálta kolinerg sejtpusztulásra. Az NMDA injektált oldal AChE tartalmú kolinerg redukcióját a kontroll oldal százalékában fejeztük ki. A grafikon a vivőanyag (V) és az ösztrén hatását mutatja a kolinerg rostveszteségre. (**p<0,01, n=6)

6.5.1.5. A PKA és a MAPK jelátviteli pályák szerepe az E2 indukálta neuroprotekcióban a BEK neuronokon

A következő kísérleteinkben tovább vizsgáltuk a nem-klasszikus jelátvivő pályarendszerek szerepét az E2 hatásaiban a BEK neuronokon. Ezért az NMDA injekció után 30 perccel a korábbi kísérleteinkben is használt MEK inhibitort, U0126-ot vagy PKA inhibitort, H-89-et adtunk az agy oldalkamrájába és vizsgáltuk az E2 kiváltotta neuroprotekció mértékét. Az E2 szignifikánsan csökkentette az NMDA kiváltotta kolinerg rostkiesést a vivőanyaggal kezelt kontroll állatokban (DMSO-t kaptak az oldalkamrába) (52 C. ábra). Ezzel szemben intracerebroventrikulárisan adott U0126 vagy H-89 blokkolta az E2 hatását a kolinerg rostpusztulásra (52. A,C ábra). Az NMDA-kiváltotta kolinerg rostpusztulás mértékét az U0126 és a H-89 nem befolyásolta (52. C ábra).



52. ábra Az E2 hatása az NMDA indukálta kolinerg sejtpusztulásra jelátvivő pálya inhibitorok jelenlétében. A-B A mikrofotók az NMDA injekeció után 1 órával adott E2 hatását mutatják intracerebroventriculárisan (icv) injektált DMSO (A) és U0126 (B) jelenlétében az AChE pozitív neuronokon az agykéregben az ipsilaterális oldalon (kalibrációs egyenes: 100 μm, fehér vonalak jelzik a réteghatárokat). C Az NMDA injektált oldal AChE tartalmú (kolinerg) rostveszteségét a kontroll oldal százalékában fejeztük ki. A grafikon a vivőanyag (V) és az E2 hatását mutatja a kolinerg sejtveszteségre U0129 vagy H-89 jelenlétében . A kontroll állatok DMSO-t kaptak icv. (n=7).

6.5.1.6. Az endogénen termelődő E2 hatása a neuroprotektív E2 kezelésre a BEK neuronokon Azért, hogy megvizsgáljuk, hogy az E2 indukálta neuroprotekció fiziológiásan változó E2-vel rendelkező állatokban is jelen van, megnéztük az E2 kezelés hatását az NMDA-indukálta rostpusztulásra áloperált diösztruszban lévő egereken. Az E2 kezelés az ovariektomizált állatokhoz hasonlóan szignifikánsan csökkentette az NMDA indukálta kolinerg rostpusztulást (vivőanyag: 40,5±3,5%; E2: 23,4±4,5%; p<0,05). Nem tapasztaltunk változást a kolinerg rostpusztulásban az ovariektomizált és a proösztruszos állatok között (vivőanyag áloperált: 40,5±3,5%; vivőanyag OVX: 57,7±8,1%). A kontralateralis oldal kolinerg rostdenzitásai sem mutattak különbségeket.

6.5.1.7. Az öregedés hatása az E2indukálta neuroprotektív folyamatokra a BEK neuronokon

Jól ismert, hogy az öregedéssel a neuronok túlélési potenciálja beszűkül. Ezért egy következő kísérletsorozatban arra kerestük a választ, hogy az egyszeri E2 kezelés hogyan hat az **NMDA** indukálta kolinerg rostpusztulásra. Ezeket a kísérleteket gonadálisan intakt fiatal felnőtt (6-8 hetes) és öreg (2 éves) hím és nőstény egereken végeztük. Az immunperoxidáz hisztokémiai azt mutatták, méréseink hogy a kontralaterális (nem ledált) oldalon lévő ChAT immunreaktív neuronok száma és a kolinerg rostok denzitása nem különbözött a hím és a nőstény állatok, valamint a fiatal és az öreg állatok között (53. A ábra). A fiatal nőstényekben az ösztrusz státusza nem



53. *ábra* Az E2 hatása az NMDA indukálta kolinerg sejtpusztulásra fiatal és öreg egereken. A Az NMDA injektált oldal AChE tartalmú (kolinerg) rostveszteségét a kontroll oldal százalékában fejeztük ki. A grafikon a vivőanyag (V) és az E2 hatását mutatja az AChE rostveszteségre gonadálisan intakt fiatal, idős, hím és nőstény egereken (n=4-9, *p<0,05, ****p<0,001). B-E A mikrofotók az NMDA injekció után 1 órával adott vivővanyag (B) és az E2 (C) hátását mutatják fiatal egerekben valamint öreg állatokban (D,E) (kalibrációs egyenes:50 µm).

befolyásolta a kolinerg neuronok számát és a rostdenzitás mértékét a kontralaterális oldalon (53. A ábra). Az NMDA-indukálta rostpusztulás nem mutatott nemi különbségeket (53. ábra A). A rostpusztulás mértéke az öreg állatokban hasonló volt a fiatalokéban megfigyeltekhez (53 ábra A).

Az E2 injekció hatékonyságát nem befolyásolta, hogy hím vagy nőstény állatokon végeztük a kezelést (53. A ábra). Idős egerekben azonban az E2 nem volt hatással az NMDA indukálta kolinerg rostpusztulásra egyik nemben sem (53. A, D, E ábra). Az E2 kezelés nem okozott változást az NMDA adása után megfigyelhető ipsilaterális ChAT immunoreaktív neuronok pusztulásában. Az ösztrusz ciklus szakasza nem befolyásolta az E2 indukálta neuroprotektív hatást fiatal nőstényekben. Továbbá az E2 kezelés nem befolyásolta a kolinerg rostdenzitást az ipsilaterális kéregben.

6.5.2. Következtetések

Az NMDA receptorok glutamáttal illetve analóg vegyületekkel történő aktivációja megnöveli a Ca²⁺ influxot és ezáltal excitotoxikus folyamatok kialakulásához vezet, mely mechanizmus alapvető szerepet játszik az akut fejsérülésekben, az ischaemiában és a neurodegeneratív kórképekben (Lee és mtsai., 1999; Kalia és mtsai., 2008). Korábbi kísérleteink azt is megmutatták, hogy az Alzheimer kór kialakulásában jelentős szerepet játszó A β_{1-42} az SI/NBM-ben lévő kolinerg sejtekre toxikus és ezen kolinerg sejtek NMDA receptorának aktivációja fontos az A β_{1-42} kolintoxikus hatásaiban az SI/NBM-ben (15, 16). Jelenlegi eredményeink jó egyezést mutatnak a korábbi adatokkal, ahol patkány SI/NBM-be adott NMDA vagy iboténsav kolinerg neuron pusztulást váltottak ki (Wenk és mtsai., 1984; Robbins és mtsai., 1989; Luiten és mtsai., 1995; Horvath és mtsai., 2000).

Érdekes módon az NMDA neurotoxikus potenciálja nem változott az öregedéssel. Ezt a megfigyelést alátámasztják a korábbi kísérletek is, ahol azt találták, hogy az öregedés önmagában nem változtatja meg a kolinerg neuronok számát és méreteit (Gibbs, 2003). Az öregedéssel csökken az NMDA receptorok száma is (Magnusson és mtsai., 2010), azonban ez a változás nagy anatómiai variabilitást mutat (Magnusson és mtsai., 2010) és a kolinerg neuronokban ez a folyamat nem ismert. Ezek az eredmények azt jelezhetik, hogy az NMDA aktivációval elindult neurotoxicitásért felelős molekuláris mechanizmusok számottevően nem változnak az öregedéssel az SI/NBM-ben lévő kolinerg neuronokon.

6.5.2.1. Az egyszeri E2 kezelés neuroprotektív a BEK neuronokon: az ERa és a nemklasszikus hatások központi szerepe

Korábban hosszan tartó, krónikus E2 előkezelést alkalmaztak a kutatók, ami egy prevenciós kezelési modellnek felelt meg (Strom és mtsai., 2009). Ezzel szemben a mi kísérleti elrendezésünkben az E2-t a lézió után adtuk az állatnak, amely így a klinikumban az akut agyi katasztrófák illetve traumák kezelését modellezi.

A kísérleti eredményeink azt mutatták, hogy az egyszeri E2 dózis nem befolyásolta az NMDA indukálta kolinerg sejtpusztulást, ami jó egyezést mutatott a korábbi MS-ben és SI/NBM-ben végzett léziós kísérlettel patkányon (Aggarwal és Gibbs, 2000; Horvath és mtsai., 2002). A magyarázat erre a jelenségre nem ismert.

Az a megfigyelés, hogy az E2 kezelés képes volt növelni a kolinerg rostdenzitást, de a kolinerg sejtpusztulást nem befolyásolta, felveti annak a lehetőségét, hogy az NMDA írtást követően az E2 kezelés hatására, a megmaradó kolinerg neuronok axon kollaterálisokat növesztenek a kérgi területeken azért, hogy a sérült illetve az elpusztult kolinerg neuronok funkcióit átvegyék. Elképzelhető az is, hogy az E2 hatására a kolinerg neuronok kevésbé lesznek fogékonyak az NMDA írtásra. A korábbi vizsgálatok azonban kiderítették, hogy az E2 képes az axon növekedését serkenteni, az entorhinális kéregben és a hippocampusban, léziót követően (Stone és mtsai., 1998; Kadish és Van Groen, 2002). Az is kizárható, hogy a kolinerg rostdenzitás emelkedés az E2-indukálta AchE expresszió növekedés miatt következik be, mivel az E2 injekciónak nem volt hatása az AchE rostdenzitásra a kontralaterális oldalon. Ezen kívül a szakirodalomban sem találunk arra utalást, hogy az egyszeri E2 injekció 12 nap elteltével növelni képes a ChaT/AchE aktivitást illetve az expresszió mértékét. Ennek alapján az E2 injekció hatásáról azt gondoljuk, hogy restauráló folyamatokat indít el a túlélő kolinerg neuronokban azáltal, hogy növeli azok axon kollaterálisainak mennyiségét az SI/NBM kortikális projekciós területein.

A restauráló folyamatokban szerepe lehet az E2 BEK neuronok TrkA receptorát érintő aktivációinak, amit az egy-molekula detekciós méréseink is alátámasztanak. A BEK neuronok expresszálnak p75 neutrofin receptort (p75NTR) is, azonban ennek a receptornak a szerepe a neutrofin aktivációban nem tisztázott és elképzelhető, hogy antitrofikus hatást gyakorol a BEK neuronokon. Ezt támasztják alá a p75NTR deficiens egerekkel kapott eredmények, amelyekben nagyobb kolinerg neuronokat találtak a basalis előagyban (Yeo és mtsai., 1997). Ez arra enged következtetni, hogy ezek a receptorok negatívan befolyásolják a kolinerg sejtek méretét.

A Wise laboratóriumában történt vizsgálatok óta tudjuk, hogy az ERa jelentős szerepet játszik az E2 protektív hatásaiban agyi ischaemiában (Dubal és mtsai., 2001). A BEK neuronok a klasszikus ösztrogén receptorokból kizárólag ERα-át expresszálnak, ezért az E2 protektív hatásaiban feltételezhetően szerepe van ennek a receptornak. Ezt erősítették meg az nERαKO egereken elvégzett kísérleteink is, melyek megmutatták, hogy az E2 az ERα-án keresztül fejti ki neuroprotektív hatásait a BEK neuronokon. Az, hogy az öregedő állatokban az E2 adása nem bizonyult hatékonynak, ugyancsak az ERα szerepének jelentőségét mutatja. Öregedő egerekben ugyanis a BEK neuronokban az ERα expressziója több mint 48%-kal csökken (Kalesnykas és mtsai., 2005), ami megmagyarázhatja az E2 hatástalanságát az öreg állatokban. Az újabb vizsgálatok szerint a BEK neuronok GPER1-et is expresszálnak (Hammond és mtsai., 2011), de ennek a membrán ösztrogén receptornak a szerepe az E2-nek a BEK neuronokra kifejtett protektív hatásaiban nem bizonyított. Habár a gliasejtek is expresszálnak ösztrogén receptorokat és jelentős szerepet tölthetnek be a neuroprotekcióban (Arevalo és mtsai., 2010), kísérletünkben kizárólag neuronokból ütöttük ki az ERα-át, ami egyértelműen a neuronális ERα szerepét hangsúlyozza az E2 hatásmechanizmusában a gliális ösztrogén receptorokkal szemben. Mivel az ERa deléció nem korlátozódott a kolinerg neuronokra, így nem zárható ki, hogy az E2 protektív hatása interneuronokon keresztül is érvényesülhet.

A jelenlegi eredményeink azt mutatták, hogy a nem-klasszikus ösztrogén jelátvivő útvonal aktivátor ösztrén hasonlóan az E2 adásához neuroprotekciót eredményez a BEK



54. ábra Klasszikus és nem-klasszikus ösztrogén jelátvivő pályarendszerek lehetésges szerepe az E2 indukálta protektív hatások kialakításában a BEK neuronokon. Az üres nyilak mutatják a receptorok illetve jelátvivő molekulák aktivitását a BEK neuronban. ERa: ösztrogén receptor a; trkA: tropomyosinhoz kapcsolt kináz A; p75NTR: p75 neurotrophin receptor; pERK 1/2: foszforilált extracellular signal-regulated kináz 1/2; PKA: protein kináz A; pCREB foszforilált cAMP response element-bindine protein.

neuronokon. Az ösztrénről korábban in vitro kísérletekben hogy megvédte leírták, а kortikális tenyészeteket az Aß neurotoxikus hatásaival szemben (Cordey és mtsai., 2005) és nem indukált ERE géntranszkripciót mediálta és 2002; (Kousteni mtsai., Moverare és mtsai., 2003). Néhány vizsgálat in vitro rámutatott, hogy az ösztrén képes bizonyos koncentráció

tartományban gyenge androgén receptor agonistaként is működni (Krishnan és mtsai., 2005), de a BEK neuronok androgén receptor expressziójáról nincs információnk egérben. Fontos megjegyezni azonban hogy az ösztrén kísérelteinkben alkalmazott dózisa nem váltott ki uterotróp hatást (Kőszegi és Ábraham nem publikált adat). Az ösztrén kísérletek azt jelzik, hogy az E2 neuroprotektív hatásaiban a nem-klasszikus jelátviteli folyamatoknak jelentős szerepe lehet. Jelen kísérleteinkben a jelátviteli rendszerek blokkolóinak (MEK illetve PKA blokkoló) alkalmazása azt mutatta, hogy képesek az E2-nek a BEK neuronok rostdenzitására gyakorolt hatásait gátolni. Ezekből az eredményekből arra a következtetésre juthatunk, hogy az E2 a PKA és a MAPK jelátviteli rendszereken keresztül indukálja a kolinerg rost restaurációt az NMDA léziót követően (54. ábra).

6.5.2.2. Az egyszeri nagy dózisú E2 injekció terápiás relevanciája

Kísérleteink eredménye szerint az endogén E2 koncentráció (ovariektómia versus intakt állatok) nem befolyásolta az NMDA indukálta rostpusztulás mértékét. Valójában csak szuprafiziológiás E2 dózisnál figyelhetünk meg protektív hatásokat. Azt is kimutattuk, hogy a terápiás időablak viszonylag szűk mivel 24 óra múlva az E2 egyszeri injekciójának nem volt hatása az NMDA indukálta kolinerg rostpusztulásra. A nőstényeken és hímeken végzett kísérletek nem mutattak nemi differenciát. Azonban az öreg állatokban az E2 protektív hatása nem érvényesült. Ezek a kísérletek arra mutatnak rá, hogy az E2 egyszeri dózisának egy adott időintervallum és koncentráció tartomány mellett lehet releváns terápiás hatása a nemtől függetlenül. Ugyanakkor arra is felhívja a figyelmet, hogy ez a jótékony hatás az öregedéssel beszűkül.

A WHI vizsgálatok óta tudjuk, hogy a HPT alkalmazásával jelentős problémák merülnek fel a mellékhatások miatt (Shumaker és mtsai., 2003), ezért fontos, hogy olyan ösztrogénszerű vegyületek után kutassunk, amelyek rendelkeznek az E2 jótékony gyógyító hatásaival, lehetőleg mellékhatások nélkül. A jelenlegi vizsgálatok szerint a nem-klasszikus ösztrogén jelátvivő pálya aktivátorok (Activators of Non-Genomic Estrogen Like Signaling (ANGELS)), mint az ösztrén, ígéretes vegyületek lehetnek, mivel E2-szerű protektív hatásokkal rendelkeznek az E2 feminizáló hatása nélkül (Manolagas és mtsai., 2002; Otto és mtsai., 2008b). Az ösztrén és a hozzá hasonló vegyületek nagy valószínűséggel fontos szerephez jutnak majd a HPT-ban, mivel biztonságosabbak lehetnek, mint az idáig alkalmazott nem szelektív ösztrogén vegyületek. A nem-klasszikus ösztrogén hatások neuroprotektív potenciáljának felfedezése és továbbfejlesztése segítséget jelenthet a BEK neuronok degenerációjával összefüggő kognitív deficittel bíró betegek terápiájában is.

7. Összefoglalás

7.1. A nem-klasszikus ösztrogén hatások a központi idegrendszerben és azok jelátvivő mechanizmusa a kolinerg és a GnRH neuronokban

Kísérleteinkben a CREB és az ERK1/2 foszoforilációját mintegy indikátorként használva kimutattuk, hogy az E2 gyorsan, nem-klasszikus módon képes aktiválni ezeket a molekulákat a központi idegrendszer különböző területein, mely nemi különbségeket mutat és ezt a hatást a klasszikus ösztrogén receptorok mediálják. Kimutattuk továbbá, hogy az E2-höz hasonlóan a genistein gyors, nem-klasszikus hatást gyakorol a hypothalamicus CREB foszforilációra neonatális korban. In vivo egy sejten végzett méréseink azt is igazolták, hogy az E2 gyorsan, nem-klasszikus módon képes az CREB-et foszforilálni a GnRH és a kolinerg neuronokban és ezt a hatást ezekben az estekben is a klasszikus ösztrogén receptorok közvetítik.

In vitro és in vivo méréseinkkel kimutattuk, hogy az E2 a CREB-et az ERK1/2 aktivációján át egy jelátvivő hálózaton keresztül foszforilálja a GnRH neuronban. Ebben az aktivációban részt vesznek a CaMKII és a PKA jelátvivő molekulák is. Az E2-indukálta CREB foszforilációhoz szükséges az ERK1/2 molekulának az ERβ-án keresztül megvalósuló direkt valamint az interneuronon keresztül létrejövő indirekt aktivációja. Az ERK1/2 feltehetőleg koincidencia detektorként működve szabályozza ezt a folyamatot. Az indirekt hatások egyik lényeges eleme az E2-nek a GABAerg neuron ER α -ján keresztül megvalósuló hatása, mely a GnRH neuronban az IP3 receptoron keresztül emeli a Ca²⁺ tranziensek számát. Ennek a jelenségnek valószínüleg szerepe van a CREB foszforiláció szabályozásában is.

In vivo és in vitro kísérelteinkben azt is kimutattuk, hogy az E2 képes a BEK neuronok TrkA receptorainak immobilizációját növelni, mely fontos szerepet játszik a receptor és a hozzá tartozó ERK/CREB jelátviteli rendszerek aktivációjában. Megmutattuk továbbá, hogy az E2 a BEK neuronokon az ERα segítségével gyorsan és közvetlenül foszorilálja a CREB-et. Ebben a foszforilációban a PKA illetve az ERK1/2 jelátvivő molekulák alapvető szerepet játszanak. Érdekes módon a CREB-et foszforiláló E2 szenzitív jelátvivő pályarendszerek anatómiai specificitást mutatnak a BEK neuronokban, mivel az MS-ben lévő kolinerg neuronokban elegendő volt az ERK1/2 az E2 indukálta CREB foszforilációhoz, míg az SI-ben a PKA is szükséges volt ehhez.

7.2. A nem-klasszikus ösztrogén hatások jelentősége

Mint minden orvosbiológiai kutatás, ezen eredmények igazi értékét is a jövőbeni klinikai hasznosulással lehet igazán lemérni, azzal, hogy a felfedező kutatás elvezet-e olyan eredményekhez, melyek később a klinikumban hasznosíthatóak lehetnek.

A szója alapú táplálékokban lévő fitoösztrogén genisteinről megtudtuk, hogy jelentős nem-klassszikus hatást gyakorol a neonatális agy hypothalamusára. Ezek az adatok, jó támpontot szolgáltatnak további klinikai kutatásokhoz, amelyekben a genisteinnek a szexuális magatartásformák kialakulására és a fertilitásra gyakorolt felnőttkorban megjelenő hatásait elemzik.

A GnRH neuron specifikus CREB KO egerekkel elvégzett kísérleteink felhívták arra a figyelmet, hogy a GnRH neuron CREB molekulái alapvető szerepet játszhatnak az ösztrogén negatív visszacsatolásában és a reprodukciós öregedésben. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az E2-nek a CREB-re gyakorolt hatása a GnRH neuronban alapvető szerepet tölt be a szaporodás szabályozásában, ezáltal egy új lendületet jelenthet az infertilitás kezelését célzó klinikai kutatásoknak is.

A kolinerg neuronok vizsgálatával megtudtuk, hogy az E2 indukálta nem-klasszikus hatásnak a neuroprotekcióban betöltött szerepe alapvető jelentőségű. A nem-klasszikus ösztrogén jelátvivő pályarendszerek szelektív aktivációjával jelentős neuroprotekciót értünk el, mely fontos támpontot adhat hatékonyabb hormonpotló kezelési stratégiák kialakításához, valamint új irányt mutat a neuroprotektív gyógyszerek fejlesztésében is.

8. Irodalom

<u>8.1. Az értekezés általános irodalomjegyzéke</u>

- Abe H, Keen KL, Terasawa E (2008) Rapid action of estrogens on intracellular calcium oscillations in primate luteinizing hormone-releasing hormone-1 neurons. Endocrinology 149:1155-1162.
- Aggarwal P, Gibbs RB (2000) Estrogen replacement does not prevent the loss of choline acetyltransferase-positive cells in the basal forebrain following either neurochemical or mechanical lesions. Brain Res 882:75-85.
- Amantea D, Russo R, Bagetta G, Corasaniti MT (2005) From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. Pharmacol Res 52:119-132.
- Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R (1971) Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. Biochem Biophys Res Commun 44:205-210.
- Antal MC, Krust A, Chambon P, Mark M (2008) Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. Proc Natl Acad Sci USA 105:2433-2438.
- Arendt T, Bigl V, Arendt A (1984) Neurone loss in the nucleus basalis of Meynert in Creutzfeldt-Jakob disease. Acta Neuropathol 65:85-88.
- Arevalo MA, Santos-Galindo M, Bellini MJ, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2010) Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection. Biochim Biophys Acta 1800:1106-1112.
- Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS (1994) Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. Proc Natl Acad Sci U S A 91:8517-8521.
- Auger AP, Tetel MJ, McCarthy MM (2000) Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) mediates the development of sex-specific brain morphology and behavior. Proc Natl Acad Sci U S A 97:7551-7555.
- Auger AP, Hexter DP, McCarthy MM (2001) Sex difference in the phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) in neonatal rat brain: Brain Research. 890 (1) (pp 110-117), 2001. Date of Publication: 26 Jan 2001.
- Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R (2002) Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. Prog Neurobiol 68:209-245.
- Bailey KJ (1987) Diurnal progesterone rhythms in the female mouse. J Endocrinol 112:15-21.
- Barnes S (1995) Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. J Nutr 125:777S-783S.
- Baum LW (2005) Sex, hormones, and Alzheimer's disease. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 60:736-743.
- Bazzett TJ, Becker JB (1994) Sex differences in the rapid and acute effects of estrogen on striatal D2 dopamine receptor binding. Brain Res 637:163-172.
- Behl C (2002) Oestrogen as a neuroprotective hormone. Nature Reviews 3:433-442.
- Belsham DD, Lovejoy DA (2005) Gonadotropin-releasing hormone: gene evolution, expression, and regulation. Vitamins and hormones 71:59-94.

- Bethea CL, Brown NA, Kohama SG (1996) Steroid regulation of estrogen and progestin receptor messenger ribonucleic acid in monkey hypothalamus and pituitary. Endocrinology 137:4372-4383.
- Boegman RJ, Cockhill J, Jhamandas K, Beninger RJ (1992) Excitotoxic lesions of rat basal forebrain: differential effects on choline acetyltransferase in the cortex and amygdala. Neuroscience 51:129-135.
- Bohnen NI, Kaufer DI, Ivanco LS, Lopresti B, Koeppe RA, Davis JG, Mathis CA, Moore RY, DeKosky ST (2003) Cortical cholinergic function is more severely affected in parkinsonian dementia than in Alzheimer disease: an in vivo positron emission tomographic study. Arch Neurol 60:1745-1748.
- Bora SH, Liu Z, Kecojevic A, Merchenthaler I, Koliatsos VE (2005) Direct, complex effects of estrogens on basal forebrain cholinergic neurons. Exp Neurol 194:506-522.
- Boulware MI, Kordasiewicz H, Mermelstein PG (2007) Caveolin proteins are essential for distinct effects of membrane estrogen receptors in neurons: Journal of Neuroscience. 27 (37) (pp 9941-9950), 2007. Date of Publication: 12 Sep 2007.
- Boulware MI, Weick JP, Becklund BR, Kuo SP, Groth RD, Mermelstein PG (2005) Estradiol activates group I and II metabotropic glutamate receptor signaling, leading to opposing influences on cAMP response element-binding protein: Journal of Neuroscience. 25 (20) (pp 5066-5078), 2005. Date of Publication: 18 May 2005.
- Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER, Dun NJ (2007) Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. J Endocrinol 193:311-321.
- Bryant DN, Bosch MA, Ronnekleiv OK, Dorsa DM (2005) 17-Beta estradiol rapidly enhances extracellular signal-regulated kinase 2 phosphorylation in the rat brain. Neuroscience 133:343-352.
- Butcher RL, Collins WE, Fugo NW (1974) Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. Endocrinology 94:1704-1708.
- Campbell RE, Han SK, Herbison AE (2005) Biocytin filling of adult gonadotropin-releasing hormone neurons in situ reveals extensive, spiny, dendritic processes. Endocrinology 146:1163-1169.
- Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ (1997) Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. Genomics 45:607-617.
- Casanova E, Fehsenfeld S, Mantamadiotis T, Lemberger T, Greiner E, Stewart AF, Schutz G (2001) A CamKIIalpha iCre BAC allows brain-specific gene inactivation. Genesis 31:37-42.
- Chaban VV, Lakhter AJ, Micevych P (2004) A membrane estrogen receptor mediates intracellular calcium release in astrocytes. Endocrinology 145:3788-3795.
- Chakravarti D, LaMorte VJ, Nelson MC, Nakajima T, Schulman IG, Juguilon H, Montminy M, Evans RM (1996) Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. Nature 383:99-103.
- Chan H, Prescott M, Ong Z, Herde MK, Herbison AE, Campbell RE (2011) Dendritic spine plasticity in gonadatropin-releasing hormone (GnRH) neurons activated at the time of the preovulatory surge. Endocrinology 152:4906-4914.
- Chappell PE, Lee J, Levine JE (2000) Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. II. role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. Endocrinology 141:1486-1492.

- Christian CA, Moenter SM (2007) Estradiol induces diurnal shifts in GABA transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons to provide a neural signal for ovulation. J Neurosci 27:1913-1921.
- Chu Z, Andrade J, Shupnik MA, Moenter SM (2009) Differential regulation of gonadotropinreleasing hormone neuron activity and membrane properties by acutely applied estradiol: dependence on dose and estrogen receptor subtype. J Neurosci 29:5616-5627.
- Conner JM, Chiba AA, Tuszynski MH (2005) The basal forebrain cholinergic system is essential for cortical plasticity and functional recovery following brain injury. Neuron 46:173-179.
- Cordey M, Gundimeda U, Gopalakrishna R, Pike CJ (2005) The synthetic estrogen 4-estren-3 alpha,17 beta-diol (estren) induces estrogen-like neuroprotection. Neurobiol Dis 19:331-339.
- Cornil CA, Ball GF, Balthazart J (2006) Functional significance of the rapid regulation of brain estrogen action: where do the estrogens come from? Brain Res 1126:2-26.
- Couse JF, Yates MM, Walker VR, Korach KS (2003) Characterization of the hypothalamicpituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ERalpha but not ERbeta. Mol Endocrinol 17:1039-1053.
- Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS (1999) Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. Science 286:2328-2331.
- Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG (1997) Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. J Biol Chem 272:19858-19862.
- Coyle JT, Price DL, DeLong MR (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. Science 219:1184-1190.
- DeFazio RA, Moenter SM (2002) Estradiol feedback alters potassium currents and firing properties of gonadotropin-releasing hormone neurons. Mol Endocrinol 16:2255-2265.
- Dierschke DJ, Yamaji T, Karsch FJ, Weick RF, Weiss G, Knobil E (1973) Blockade by progesterone of estrogen-induced LH and FSH release in the rhesus monkey. Endocrinology 92:1496-1501.
- Dominguez R, Jalali C, de Lacalle S (2004) Morphological effects of estrogen on cholinergic neurons in vitro involves activation of extracellular signal-regulated kinases. J Neurosci 24:982-990.
- Dorling AA, Todman MG, Korach KS, Herbison AE (2003) Critical role for estrogen receptor alpha in negative feedback regulation of gonadotropin-releasing hormone mRNA expression in the female mouse. Neuroendocrinology 78:204-209.
- Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Kindy MS, Wise PM (2001) Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98:1952-1957.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M (2000) Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. Pharmacol Rev 52:513-556.
- Filardo E, Quinn J, Pang Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, Thomas P (2007) Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. Endocrinology 148:3236-3245.
- Filardo EJ, Thomas P (2005) GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. Trends Endocrinol Metab 16:362-367.

- Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Jr., Bland KI (2002) Estrogen action via the G proteincoupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. Mol Endocrinol 16:70-84.
- Finkbeiner S (2000) CREB couples neurotrophin signals to survival messages. Neuron 25:11-14.
- Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME (1997) CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. Neuron 19:1031-1047.
- Fischette CT, Biegon A, McEwen BS (1984) Sex steroid modulation of the serotonin behavioral syndrome. Life Sci 35:1197-1206.
- Flanagan-Cato LM (2000) Estrogen-induced remodeling of hypothalamic neural circuitry. Front Neuroendocrinol 21:309-329.
- Fliss AE, Benzeno S, Rao J, Caplan AJ (2000) Control of estrogen receptor ligand binding by Hsp90. J Steroid Biochem Mol Biol 72:223-230.
- Franklin TB, Perrot-Sinal TS (2006) Sex and ovarian steroids modulate brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in rat hippocampus under stressful and non-stressful conditions. Psychoneuroendocrinology 31:38-48.
- Fugger HN, Kumar A, Lubahn DB, Korach KS, Foster TC (2001) Examination of estradiol effects on the rapid estradiol mediated increase in hippocampal synaptic transmission in estrogen receptor alpha knockout mice. Neurosci Lett 309:207-209.
- Garcia-Segura LM, Torres-Aleman I, Naftolin F (1989) Astrocytic shape and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity are modified by estradiol in primary rat hypothalamic cultures. Brain Res Dev Brain Res 47:298-302.
- Gaykema RP, van Weeghel R, Hersh LB, Luiten PG (1991) Prefrontal cortical projections to the cholinergic neurons in the basal forebrain. J Comp Neurol 303:563-583.
- Gibbs RB (1998) Levels of trkA and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement. Brain Res 810:294-294.
- Gibbs RB (2003) Effects of ageing and long-term hormone replacement on cholinergic neurones in the medial septum and nucleus basalis magnocellularis of ovariectomized rats. J Neuroendocrinol 15:477-485.
- Gibbs RB, Aggarwal P (1998) Estrogen and basal forebrain cholinergic neurons: implications for brain aging and Alzheimer's disease-related cognitive decline. Horm Behav 34:98-9111.
- Gibbs RB, Hashash A, Johnson DA (1997) Effects of estrogen on potassium-stimulated acetylcholine release in the hippocampus and overlying cortex of adult rats. Brain Res 749:143-146.
- Gibbs RB, Wu D, Hersh LB, Pfaff DW (1994) Effects of estrogen replacement on the relative levels of choline acetyltransferase, trkA, and nerve growth factor messenger RNAs in the basal forebrain and hippocampal formation of adult rats. Exp Neurol 129:70-80.
- Gieske MC, Kim HJ, Legan SJ, Koo Y, Krust A, Chambon P, Ko C (2008) Pituitary gonadotroph estrogen receptor-alpha is necessary for fertility in females. Endocrinology 149:20-27.
- Gill S, Lavoie HB, Bo-Abbas Y, Hall JE (2002) Negative feedback effects of gonadal steroids are preserved with aging in postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab 87:2297-2302.
- Glidewell-Kenney C, Hurley LA, Pfaff L, Weiss J, Levine JE, Jameson JL (2007) Nonclassical estrogen receptor alpha signaling mediates negative feedback in the female mouse reproductive axis. Proc Natl Acad Sci U S A 104:8173-8177.

- Gore AC, Oung T, Yung S, Flagg RA, Woller MJ (2000) Neuroendocrine mechanisms for reproductive senescence in the female rat: gonadotropin-releasing hormone neurons. Endocrine 13:315-323.
- Gorosito SV, Lorenzo AG, Cambiasso MJ (2008) Estrogen receptor alpha is expressed on the cell-surface of embryonic hypothalamic neurons. Neuroscience 154:1173-1177.
- Grattan DR, Selmanoff M (1997) Sex differences in the activity of gamma-aminobutyric acidergic neurons in the rat hypothalamus. Brain Res 775:244-249.
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. Nature 320:134-139.
- Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. Nat Rev Drug Discov 3:950-964.
- Grove-Strawser D, Sower SA, Ronsheim PM, Connolly JB, Bourn CG, Rubin BS (2002) Guinea pig GnRH: localization and physiological activity reveal that it, not mammalian GnRH, is the major neuroendocrine form in guinea pigs. Endocrinology 143:1602-1612.
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC (2002) Production and actions of estrogens. N Engl J Med 346:340-352.
- Gu G, Rojo AA, Zee MC, Yu J, Simerly RB (1996) Hormonal regulation of CREB phosphorylation in the anteroventral periventricular nucleus: Journal of Neuroscience. 16 (9) (pp 3035-3044), 1996. Date of Publication: 01 May 1996.
- Gu Q, Moss RL (1996) 17 beta-Estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade. J Neurosci 16:3620-3629.
- Guerra B, Diaz M, Alonso R, Marin R (2004) Plasma membrane oestrogen receptor mediates neuroprotection against beta-amyloid toxicity through activation of Raf-1/MEK/ERK cascade in septal-derived cholinergic SN56 cells. J Neurochem 91:99-9109.
- Gustafsson JA (1999) Estrogen receptor β a new dimension in estrogen mechanism of action. J Endocrinol 163:379-383.
- Haisenleder DJ, Dalkin AC, Ortolano GA, Marshall JC, Shupnik MA (1991) A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. Endocrinology 128:509-517.
- Hall JE, Lavoie HB, Marsh EE, Martin KA (2000) Decrease in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency with aging in postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab 85:1794-1800.
- Hammond R, Nelson D, Gibbs RB (2011) GPR30 co-localizes with cholinergic neurons in the basal forebrain and enhances potassium-stimulated acetylcholine release in the hippocampus. Psychoneuroendocrinology 36:182-192.
- Hanukoglu I (1992) Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. J Steroid Biochem Mol Biol 43:779-804.
- Harkany T, Lengyel Z, Soos K, Penke B, Luiten PG, Gulya K (1995) Cholinotoxic effects of beta-amyloid (1-42) peptide on cortical projections of the rat nucleus basalis magnocellularis. Brain Res 695:71-75.
- Harkany T, Abraham I, Konya C, Nyakas C, Zarandi M, Penke B, Luiten PG (2000) Mechanisms of beta-amyloid neurotoxicity: perspectives of pharmacotherapy. Rev Neurosci 11:329-382.
- Hartikka J, Hefti F (1988) Development of septal cholinergic neurons in culture: plating density and glial cells modulate effects of NGF on survival, fiber growth, and expression of transmitter-specific enzymes. J Neurosci 8:2967-2985.

- Herbison AE (1994) Somatostatin-immunoreactive neurones in the hypothalamic ventromedial nucleus possess oestrogen receptors in the male and female rat. J Neuroendocrinol 6:323-328.
- Herbison AE (2009) Rapid actions of oestrogen on gonadotropin-releasing hormone neurons; from fantasy to physiology? J Physiol 587:5025-5030.
- Herbison AE, Pape JR (2001) New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. Front Neuroendocrinol 22:292-308.
- Herbison AE, Porteous R, Pape JR, Mora JM, Hurst PR (2008) Gonadotropin-releasing hormone neuron requirements for puberty, ovulation, and fertility. Endocrinology 149:597-604.
- Hewitt SC, Collins J, Grissom S, Hamilton K, Korach KS (2006) Estren behaves as a weak estrogen rather than a nongenomic selective activator in the mouse uterus. Endocrinology 147:2203-2214.
- Horvath KM, Abraham IM, Harkany T, Meerlo P, Bohus BG, Nyakas C, Luiten PG (2000) Postnatal treatment with ACTH-(4-9) analog ORG 2766 attenuates N-methyl-Daspartate-induced excitotoxicity in rat nucleus basalis in adulthood. Eur J Pharmacol 405:33-42.
- Horvath KM, Hartig W, Van der Veen R, Keijser JN, Mulder J, Ziegert M, Van der Zee EA, Harkany T, Luiten PGM (2002) 17beta-estradiol enhances cortical cholinergic innervation and preserves synaptic density following excitotoxic lesions to the rat nucleus basalis magnocellularis. Neuroscience 110:489-504.
- Hrabovszky E, Kallo I, Szla´ vik N, Keller E, Merchenthaler I, Liposits Z (2007) Gonadotropin-releasing hormone neurons express estrogen receptor-β J Clin Endocrinol Metab 92:2827-2830.
- Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszan T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL (2000) Detection of estrogen receptor-β messenger ribonucleic acid and 125-I estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. Endocrinology 149:3506-3509.
- Hrabovszky E, Steinhauser A, Barabas K, Shughrue PJ, Petersen SL, Merchenthaler I, Liposits Z (2001) Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. Endocrinology 142:3261-3264.
- Hreib KK, Rosene DL, Moss MB (1988) Basal forebrain efferents to the medial dorsal thalamic nucleus in the rhesus monkey. J Comp Neurol 277:365-390.
- Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Deloulme JC, Chan G, Storm DR (1998) Cross talk between ERK and PKA is required for Ca2+ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. Neuron 21:869-883.
- Jasoni CL, Porteous RW, Herbison AE (2009) Anatomical location of mature GnRH neurons corresponds with their birthdate in the developing mouse. Dev Dyn 238:524-531.
- Jasoni CL, Todman MG, Strumia MM, Herbison AE (2007) Cell type-specific expression of a genetically encoded calcium indicator reveals intrinsic calcium oscillations in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. J Neurosci 27:860-867.
- Jennes L, Stumpf WE (1986) Gonadotropin-releasing hormone immunoreactive neurons with access to fenestrated capillaries in mouse brain. Neuroscience 18:403-416.
- Jimenez-Linan M, Rubin BS, King JC (1997) Examination of guinea pig luteinizing hormone-releasing hormone gene reveals a unique decapeptide and existence of two transcripts in the brain. Endocrinology 138:4123-4130.
- Kadish I, Van Groen T (2002) Low levels of estrogen significantly diminish axonal sprouting after entorhinal cortex lesions in the mouse. J Neurosci 22:4095-4102.

- Kalesnykas G, Roschier U, Puolivali J, Wang J, Miettinen R (2005) The effect of aging on the subcellular distribution of estrogen receptor-alpha in the cholinergic neurons of transgenic and wild-type mice. Eur J Neurosci 21:1437-1442.
- Kalia LV, Kalia SK, Salter MW (2008) NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. Lancet Neurol 7:742-755.
- Kartha KN, Ramakrishna T (1996) The role of sexually dimorphic medical preoptic area of the hypothalamus in the sexual behaviour of male and female rats. Physiol Res 45:459-466.
- Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ediger TR, Sun J, Ekena K, Lazennec G, Martini PG, McInerney EM, Delage-Mourroux R, Weis K, Katzenellenbogen JA (2000) Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. Recent Prog Horm Res 55:163-193; discussion 194-165.
- Kelly MJ, Qiu J (2010) Estrogen signaling in hypothalamic circuits controlling reproduction. Brain Res 1364:44-52.
- Kelly MJ, Moss RL, Dudley CA (1976) Differential sensitivity of preoptic-septal neurons to microelectrophoresed estrogen during the estrous cycle. Brain Res 114:152-157.
- Kelly MJ, Lagrange AH, Wagner EJ, Ronnekleiv OK (1999) Rapid effects of estrogen to modulate G protein-coupled receptors via activation of protein kinase A and protein kinase C pathways. Steroids 64:64-75.
- Kermath BA, Gore AC (2012) Neuroendocrine control of the transition to reproductive senescence: lessons learned from the female rodent model. Neuroendocrinology 96:1-12.
- Kim KH, Patel L, Tobet SA, King JC, Rubin BS, Stopa EG (1999) Gonadotropin-releasing hormone immunoreactivity in the adult and fetal human olfactory system. Brain Res 826:220-229.
- Kimura D (1992) Sex differences in the brain. Sci Am 267:118-125.
- Kitt CA, Mitchell SJ, DeLong MR, Wainer BH, Price DL (1987) Fiber pathways of basal forebrain cholinergic neurons in monkeys. Brain Res 406:192-206.
- Klinge CM (2000) Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. Steroids 65:227-251.
- Kornhauser JM, Cowan CW, Shaywitz AJ, Dolmetsch RE, Griffith EC, Hu LS, Haddad C, Xia Z, Greenberg ME (2002) CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. Neuron 34:221-233.
- Koszegi Z, Szego E, Tolod-Kemp E, Potapov D, Kwakowsky A, Abraham IM (2011) Estrogens and neuroprotection mechanisms in cholinergic neurons. 8th IBRO World Congress of Neuroscience THE DIVERSE ACTIONS OF ESTROGENS IN HOMEOSTATIC REGULATION:W12.
- Kouki T, Kishitake M, Okamoto M, Oosuka I, Takebe M, Yamanouchi K (2003) Effects of neonatal treatment with phytoestrogens, genistein and daidzein, on sex difference in female rat brain function: estrous cycle and lordosis. Horm Behav 44:140-145.
- Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC (2001) Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. Cell 104:719-730.
- Kousteni S, Chen JR, Bellido T, Han L, Ali AA, O'Brien CA, Plotkin L, Fu Q, Mancino AT, Wen Y, Vertino AM, Powers CC, Stewart SA, Ebert R, Parfitt AM, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC (2002) Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. Science 298:843-846.

- Kow LM, Pfaff DW (2004) The membrane actions of estrogens can potentiate their lordosis behavior-facilitating genomic actions. Proc Natl Acad Sci 101:12354-12357.
- Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. Proc Natl Acad Sci U S A 95:15677-15682.
- Krishnan V, Bullock HA, Yaden BC, Liu M, Barr RJ, Montrose-Rafizadeh C, Chen K, Dodge JA, Bryant HU (2005) The nongenotropic synthetic ligand 4-estren-3alpha17beta-diol is a high-affinity genotropic androgen receptor agonist. Mol Pharmacol 67:744-748.
- Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci U S A 93:5925-5930.
- Kuiper GGJM, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA (1998) The estrogen receptor β subtype: A novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. Front Neuroendocrinol 19:253-286.
- Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . Endocrinology 138:863-870.
- Kusumi A, Sako Y, Yamamoto M (1993) Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calciuminduced differentiation in cultured epithelial cells. Biophys J 65:2021-2040.
- Lagrange AH, Ronnekleiv OK, Kelly MJ (1995) Estradiol-17 beta and mu-opioid peptides rapidly hyperpolarize GnRH neurons: a cellular mechanism of negative feedback? Endocrinology 136:2341-2344.
- Lagrange AH, Wagner EJ, Ronnekleiv OK, Kelly MJ (1996) Estrogen rapidly attenuates a GABAB response in hypothalamic neurons. Neuroendocrinology 64:114-123.
- Lee B, Butcher GQ, Hoyt KR, Impey S, Obrietan K (2005) Activity-dependent neuroprotection and cAMP response element-binding protein (CREB): kinase coupling, stimulus intensity, and temporal regulation of CREB phosphorylation at serine 133. J Neurosci 25:1137-1148.
- Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW (1999) The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. Nature 399:A7-14.
- Lehericy S, Hirsch EC, Cervera-Pierot P, Hersh LB, Bakchine S, Piette F, Duyckaerts C, Hauw JJ, Javoy-Agid F, Agid Y (1993) Heterogeneity and selectivity of the degeneration of cholinergic neurons in the basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. J Comp Neurol 330:15-31.
- Lehman MN, Robinson JE, Karsch FJ, Silverman AJ (1986) Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. J Comp Neurol 244:19-35.
- Lehmann J, Nagy JI, Atmadia S, Fibiger HC (1980) The nucleus basalis magnocellularis: the origin of a cholinergic projection to the neocortex of the rat. Neuroscience 5:1161-1174.
- Leranth C, Petnehazy O, MacLusky NJ (2003) Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. J Neurosci 23:1588-1592.
- Leranth C, Roth RH, Elsworth JD, Naftolin F, Horvath TL, Redmond DE, Jr. (2000) Estrogen is essential for maintaining nigrostriatal dopamine neurons in primates: implications for Parkinson's disease and memory. J Neurosci 20:8604-8609.
- Levine JE, Ramirez VD (1980) In vivo release of luteinizing hormone-releasing hormone estimated with push-pull cannulae from the mediobasal hypothalami of ovariectomized, steroid-primed rats. Endocrinology 107:1782-1790.

- Lewis PR, Shute CC (1967) The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic crest. Brain 90:521-540.
- Li L, Haynes MP, Bender JR (2003) Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 100:4807-4812.
- Liu D, Jiang H, Grange RW (2005) Genistein activates the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate signaling pathway in vascular endothelial cells and protects endothelial barrier function. Endocrinology 146:1312-1320.
- Lu JK, LaPolt PS, Nass TE, Matt DW, Judd HL (1985) Relation of circulating estradiol and progesterone to gonadotropin secretion and estrous cyclicity in aging female rats. Endocrinology 116:1953-1959.
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O (1993) Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. Proc Natl Acad Sci U S A 90:11162-11166.
- Luiten PG, Spencer DG, Traber J, Gaykema RP (1985) The pattern of cortical projections from the intermediate parts of the magnocellular nucleus basalis in the rat demonstrated by tracing with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. Neurosci Lett 57:137-142.
- Luiten PG, Gaykema RP, Traber J, Spencer DG (1987) Cortical projection patterns of magnocellular basal nucleus subdivisions as revealed by anterogradely transported Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. Brain Res 413:229-250.
- Luiten PG, Douma BR, Van der Zee EA, Nyakas C (1995) Neuroprotection against NMDA induced cell death in rat nucleus basalis by Ca2+ antagonist nimodipine, influence of aging and developmental drug treatment. Neurodegeneration 4:307-314.
- Maccioni RB, Munoz JP, Barbeito L (2001) The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. Arch Med Res 32:367-381.
- MacLusky NJ, McEwen BS (1978) Oestrogen modulates progestin receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. Nature 274:276-278.
- Magnusson KR, Brim BL, Das SR (2010) Selective Vulnerabilities of N-methyl-D-aspartate (NMDA) Receptors During Brain Aging. Front Aging Neurosci 2:11-11.
- Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL (2002) Sex steroids and bone. Recent Prog Horm Res 57:385-409.
- Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, Kern H, Kretz O, Martin Villalba A, Tronche F, Kellendonk C, Gau D, Kapfhammer J, Otto C, Schmid W, Schutz G (2002) Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. Nat Genet 31:47-54.
- Marin R, Guerra B, Morales A, Diaz M, Alonso R (2003a) An oestrogen membrane receptor participates in estradiol actions for the prevention of amyloid-beta peptide1-40induced toxicity in septal-derived cholinergic SN56 cells. J Neurochem 85:1180-1189.
- Marin R, Guerra B, Hernandez-Jimenez JG, Kang XL, Fraser JD, Lopez FJ, Alonso R (2003b) Estradiol prevents amyloid-beta peptide-induced cell death in a cholinergic cell line via modulation of a classical estrogen receptor. Neuroscience 121:917-926.
- Maruyama K, Endoh H, Sasaki-Iwaoka H, Kanou H, Shimaya E, Hashimoto S, Kato S, Kawashima H (1998) A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regular of estrogen action. Biochem Biophys Res Commun 246:142-147.
- Matthies H, Schulz S, Thiemann W, Siemer H, Schmidt H, Krug M, Hollt V (1997) Design of a multiple slice interface chamber and application for resolving the temporal

pattern of CREB phosphorylation in hippocampal long-term potentiation. J Neurosci Methods 78:173-179.

- McEwen B (2002) Estrogen actions throughout the brain. Recent Prog Horm Res 57:357-384.
- McEwen BS, Alves SE (1999) Estrogen actions in the central nervous system. Endocr Rev 20:279-307.
- Merchenthaler I, Gorcs T, Setalo GJ, Petrusz P, Flerko B (1984) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain Cell Tissue Res 237:15-29.
- Merchenthaler I, Setalo G, Petrusz P, Negro-Vilar A, Flerko B (1989) Identification of hypophysiotropic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons by combined retrograde labeling and immunocytochemistry. Exp Clin Endocrinol 94:133-140.
- Mermelstein PG (2009) Membrane-localised oestrogen receptor alpha and beta influence neuronal activity through activation of metabotropic glutamate receptors. J Neuroendocrinol 21:257-262.
- Mermelstein PG, Micevych PE (2008) Nervous system physiology regulated by membrane estrogen receptors. Rev Neurosci 19:413-424.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI (1983a) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). Neuroscience 10:1185-1201.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, Wainer BH (1983b) Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. J Comp Neurol 214:170-197.
- Mhyre AJ, Dorsa DM (2006) Estrogen activates rapid signaling in the brain: Role of estrogen receptor α and estrogen receptor β in neurons and glia. Neuroscience 138:851-858.
- Micevych P, Dominguez R (2009) Membrane estradiol signaling in the brain. Front Neuroendocrinol 30:315-327.
- Micevych PE, Mermelstein PG (2008) Membrane estrogen receptors acting through metabotropic glutamate receptors: an emerging mechanism of estrogen action in brain. Molecular neurobiology 38:66-77.
- Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F (2000) Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. EMBO J 19:5406-5417.
- Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, Pfaff DW, Ogawa S, Rohrer SP, Schaeffer JM, McEwen BS, Alves SE (2003) Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. Endocrinology 144:2055-2067.
- Moenter SM, Caraty A, Lehman MN, Karsch FJ (1993) Characterization and regulation of pre-ovulatory secretion of gonadotrophin-releasing hormone. Human reproduction (Oxford, England) 8 Suppl 2:51-56.
- Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM (1998) Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. Biochem Biophys Res Commun 247:75-78.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. FEBS Lett 392:49-53.
- Moverare S, Dahllund J, Andersson N, Islander U, Carlsten H, Gustafsson J-A, Nilsson S, Ohlsson C (2003) Estren is a selective estrogen receptor modulator with transcriptional activity. Mol Pharmacol 64:1428-1433.

- Muchekehu RW, Harvey BJ (2008) 17beta-estradiol rapidly mobilizes intracellular calcium from ryanodine-receptor-gated stores via a PKC-PKA-Erk-dependent pathway in the human eccrine sweat gland cell line NCL-SG3. Cell Calcium 44:276-288.
- Murphy DD, Segal M (1997) Morphological plasticity of dendritic spines in central neurons is mediated by activation of cAMP response element binding protein. Proc Natl Acad Sci U S A 94:1482-1487.
- Naftolin F (1994) Brain aromatization of androgens. J Reprod Med 39:257-261.
- Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A (2001) Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca2+. Proc Natl Acad Sci U S A 98:3197-3202.
- Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. Genesis 26:99-109.
- Nass TE, LaPolt PS, Judd HL, Lu JK (1984) Alterations in ovarian steroid and gonadotrophin secretion preceding the cessation of regular oestrous cycles in ageing female rats. J Endocrinol 100:43-50.
- Nethrapalli IS, Singh M, Guan X, Guo Q, Lubahn DB, Korach KS, Toran-Allerand CD (2001) Estradiol (E2) elicits SRC phosphorylation in the mouse neocortex: the initial event in E2 activation of the MAPK cascade? Endocrinology 142:5145-5148.
- Niewiadomska G, Mietelska-Porowska A, Mazurkiewicz M (2011) The cholinergic system, nerve growth factor and the cytoskeleton. Behav Brain Res 221:515-526.
- Nilsson BO, Olde B, Leeb-Lundberg LM (2011) G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER1)/GPR30: a new player in cardiovascular and metabolic oestrogenic signalling. Br J Pharmacol 163:1131-1139.
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA (2001) Mechanisms of estrogen action. Physiol Rev 81:1535-1565.
- Nishimura I, Ui-Tei K, Saigo K, Ishii H, Sakuma Y, Kato M (2008) 17beta-estradiol at physiological concentrations augments Ca(2+) -activated K+ currents via estrogen receptor beta in the gonadotropin-releasing hormone neuronal cell line GT1-7. Endocrinology 149:774-782.
- Nonomura T, Hatanaka H (1992) Neurotrophic effect of brain-derived neurotrophic factor on basal forebrain cholinergic neurons in culture from postnatal rats. Neurosci Res 14:226-233.
- Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP (2004) Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. Nat Rev Drug Discov 3:27-41.
- O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U (2004) Genomic targets of nuclear estrogen receptors. Mol Endocrinol 18:1859-1875.
- Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. Science 270:1354-1357.
- Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D, Langer G, Bader B, Prelle K, Nubbemeyer R, Fritzemeier K-H (2008a) G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. Endocrinology 149:4846-4856.
- Otto C, Fuchs I, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Andreasen P, Schwarz G, Altmann H, Klewer M, Schoor M, Vonk R, Fritzemeier KH (2009) GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. Biol Reprod 80:34-41.
- Otto C, Fuchs I, Altmann H, Klewer M, Schwarz G, Bohlmann R, Nguyen D, Zorn L, Vonk R, Prelle K, Osterman T, Malmstrom C, Fritzemeier K-H (2008b) In vivo characterization of estrogen receptor modulators with reduced genomic versus nongenomic activity in vitro. J Steroid Biochem Mol Biol 111:95-9100.

- Pappas TC, Gametchu B, Watson CS (1995) Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. FASEB J 9:404-410.
- Park OK, Ramirez VD (1989) Spontaneous changes in LHRH release during the rat estrous cycle, as measured with repetitive push-pull perfusions of the pituitary gland in the same female rats. Neuroendocrinology 50:66-72.
- Patisaul HB, Polston EK (2008) Influence of endocrine active compounds on the developing rodent brain. Brain Res Rev 57:352-362.
- Patisaul HB, Melby M, Whitten PL, Young LJ (2002) Genistein affects ER beta- but not ER alpha-dependent gene expression in the hypothalamus. Endocrinology 143:2189-2197.
- Paxinos G, Franklin KBJ, eds (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates, 2nd Edition. San Diego: Academic Press.
- Pearson RC, Gatter KC, Brodal P, Powell TP (1983) The projection of the basal nucleus of Meynert upon the neocortex in the monkey. Brain Res 259:132-136.
- Pedram A, Razandi M, Levin ER (2006) Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. Mol Endocrinol 20:1996-2009.
- Perez SE, Chen EY, Mufson EJ (2003) Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. Brain Res Dev Brain Res 145:117-139.
- Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Bergmann K, Gibson PH, Perry RH (1978) Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. Br Med J 2:1457-1459.
- Petersen DN, Tkalcevic GT, Koza-Taylor PH, Turi TG, Brown TA (1998) Identification of estrogen receptor beta2, a functional variant of estrogen receptor beta expressed in normal rat tissues. Endocrinology 139:1082-1092.
- Pfaff DW, Sakuma Y (1979) Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. J Physiol 288:203-210.
- Ping SE, Trieu J, Wlodek ME, Barrett GL (2008) Effects of estrogen on basal forebrain cholinergic neurons and spatial learning. J Neurosci Res 86:1588-1598.
- Platania P, Laureanti F, Bellomo M, Giuffrida R, Giuffrida-Stella AM, Catania MV, Sortino MA (2003) Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in the spinal cord during postnatal development: localization in glial cells. Neuroendocrinology 77:334-340.
- Prossnitz ER, Barton M (2011) The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. Nat Rev Endocrinol 7:715-726.
- Prossnitz ER, Oprea TI, Sklar LA, Arterburn JB (2008) The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. J Steroid Biochem Mol Biol 109:350-353.
- Pugazhenthi S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, Reusch JE (2000) Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. J Biol Chem 275:10761-10766.
- Purves-Tyson TD, Keast JR (2004) Rapid actions of estradiol on cyclic amp responseelement binding protein phosphorylation in dorsal root ganglion neurons. Neuroscience 129:629-637.
- Qiu J, Bosch MA, Jamali K, Xue C, Kelly MJ, Ronnekleiv OK (2006) Estrogen upregulates T-type calcium channels in the hypothalamus and pituitary. J Neurosci 26:11072-11082.
- Qiu J, Bosch MA, Tobias SC, Grandy DK, Scanlan TS, Ronnekleiv OK, Kelly MJ (2003) Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-proteincoupled estrogen receptor that activates protein kinase C. J Neurosci 23:9529-9540.

- Ravin HA, Zacks SI, Seligman AM (1953) The histochemical localization of acetylcholinesterase in nervous tissue. J Pharmacol Exp Ther 107:37-53.
- Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER (1999) Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. Mol Endocrinol 13:307-319.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. Science 307:1625-1630.
- Robbins TW, Everitt BJ, Marston HM, Wilkinson J, Jones GH, Page KJ (1989) Comparative effects of ibotenic acid- and quisqualic acid-induced lesions of the substantia innominata on attentional function in the rat: further implications for the role of the cholinergic neurons of the nucleus basalis in cognitive processes. Behav Brain Res 35:221-240.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SAA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA 288:321-333.
- Rudick CN, Gibbs RB, Woolley CS (2003) A role for the basal forebrain cholinergic system in estrogen-induced disinhibition of hippocampal pyramidal cells. J Neurosci 23:4479-4490.
- Rudolph D, Tafuri A, Gass P, Hammerling GJ, Arnold B, Schutz G (1998) Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. Proc Natl Acad Sci U S A 95:4481-4486.
- Saenz C, Dominguez R, de Lacalle S (2006) Estrogen contributes to structural recovery after a lesion. Neurosci Lett 392:198-201.
- Saini HS, Gorse KM, Boxer LM, Sato-Bigbee C (2004) Neurotrophin-3 and a CREBmediated signaling pathway regulate Bcl-2 expression in oligodendrocyte progenitor cells. J Neurochem 89:951-961.
- Sakuma Y (2009) Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat. J Neuroendocrinol 21:410-414.
- Salmond CH, Chatfield DA, Menon DK, Pickard JD, Sahakian BJ (2005) Cognitive sequelae of head injury: involvement of basal forebrain and associated structures. Brain 128:189-200.
- Santagati S, Melcangi RC, Celotti F, Martini L, Maggi A (1994) Estrogen receptor is expressed in different types of glial cells in culture. J Neurochem 63:2058-2064.
- Sarkar DK, Chiappa SA, Fink G, Sherwood NM (1976) Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. Nature 264:461-463.
- Saunders-Pullman R (2003) Estrogens and Parkinson disease: neuroprotective, symptomatic, neither, or both? Endocrine 21:81-87.
- Schally AV, Arimura AA, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RMG, Debeljuk L (1971) Gonadotrophin-releasing hormone: One polypeptide regulates secretion of Luteinizing and Follicle-stimulating hormones. Science 173:1036-1037.
- Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW (1989) Origin of luteinizing hormone-releasing neurons. Nature 338:161-164.
- Scott CJ, Pereira AM, Rawson JA, Simmons DM, Rossmanith WG, Ing NH, Clarke IJ (2000) The distribution of progesterone receptor immunoreactivity and mRNA in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: upregulation of progesterone receptor mRNA in the mediobasal hypothalamus by oestrogen. J Neuroendocrinol 12:565-575.
- Segal M, Murphy D (2001) Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates. Horm Behav 40:156-159.

- Setalo GJ, Singh M, Guan X, Toran-Allerand CD (2002) Estradiol-induced phosphorylation of ERK1/2 in explants of the mouse cerebral cortex: The roles of heat shock protein 90 (Hsp90) and MEK2. J Neurobiol 50:1-12.
- Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE (1998) Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. Am J Clin Nutr 68:1461.
- Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. Annu Rev Biochem 68:821-861.
- Sherwood NM, Lovejoy DA, Coe IR (1993) Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones. Endocr Rev 14:241-254.
- Shibata SC, Hibino K, Mashimo T, Yanagida T, Sako Y (2006) Formation of signal transduction complexes during immobile phase of NGFR movements. Biochem Biophys Res Commun 342:316-322.
- Shughrue P, Scrimo P, Lane M, Askew R, Merchenthaler I (1997a) The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in forebrain regions of the estrogen receptor-alpha knockout mouse. Endocrinology 138:5649-5652.
- Shughrue PJ, Komm BS, Merchenthaler I (1996) The distribution of estrogen receptor β mRNA in the rat hypothalamus. Steroids 61:678-681.
- Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I (1997b) Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. J Comp Neurol 388:507-525.
- Shughrue PJ, Scrimo PJ, Merchenthaler I (2000) Estrogen binding and estrogen receptor characterization (ERalpha and ERbeta) in the cholinergic neurons of the rat basal forebrain. Neuroscience 96:41-49.
- Shughrue PJ, Askew GR, Dellovade TL, Merchenthaler I (2002) Estrogen-binding sites and their functional capacity in estrogen receptor double knockout mouse brain. Endocrinology 143:1643-1650.
- Shumaker SA, Legault C, Rapp SR, Thal L, Wallace RB, Ockene JK, Hendrix SL, Jones BN, 3rd, Assaf AR, Jackson RD, Kotchen JM, Wassertheil-Smoller S, Wactawski-Wende J (2003) Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. JAMA 289:2651-2662.
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S (1998) CREB and memory. Annu Rev Neurosci 21:127-148.
- Silverman AJ, Jhamandas J, Renaud LP (1987) Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. J Neurosci 7:2312-2319.
- Sim JA, Skynner MJ, Pape JR, Herbison AE (2000) Late postnatal reorganization of GABA(A) receptor signalling in native GnRH neurons. Eur J Neurosci 12:3497-3504.
- Simerly RB (2002) Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. Annu Rev Neurosci 25:507-536.
- Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK (2000) Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. Nature 407:538-541.
- Simson R, Sheets ED, Jacobson K (1995) Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. Biophys J 69:989-993.
- Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, Dorsa DM (1999) The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. J Neurosci 19:2455-2463.

- Singh SP, Wolfe A, Ng Y, DiVall SA, Buggs C, Levine JE, Wondisford FE, Radovick S (2009) Impaired estrogen feedback and infertility in female mice with pituitary-specific deletion of estrogen receptor alpha (ESR1). Biol Reprod 81:488-496.
- Skinner DC, Albertson AJ, Navratil A, Smith A, Mignot M, Talbott H, Scanlan-Blake N (2009) Effects of gonadotrophin-releasing hormone outside the hypothalamicpituitary-reproductive axis. J Neuroendocrinol 21:282-292.
- Sobreviela T, Clary DO, Reichardt LF, Brandabur MM, Kordower JH, Mufson EJ (1994) TrkA-immunoreactive profiles in the central nervous system: colocalization with neurons containing p75 nerve growth factor receptor, choline acetyltransferase, and serotonin. J Comp Neurol 350:587-611.
- Sohrabji F, Lewis DK (2006) Estrogen-BDNF interactions: implications for neurodegenerative diseases. Front Neuroendocrinol 27:404-414.
- Spergel DJ, Kruth U, Hanley DF, Sprengel R, Seeburg PH (1999) GABA- and glutamateactivated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. J Neurosci 19:2037-2050.
- Srivastava DP, Woolfrey KM, Jones KA, Shum CY, Lash LL, Swanson GT, Penzes P (2008) Rapid enhancement of two-step wiring plasticity by estrogen and NMDA receptor activity. Proc Natl Acad Sci U S A 105:14650-14655.
- Stone DJ, Rozovsky I, Morgan TE, Anderson CP, Finch CE (1998) Increased synaptic sprouting in response to estrogen via an apolipoprotein E-dependent mechanism: implications for Alzheimer's disease. J Neurosci 18:3180-3185.
- Strom JO, Theodorsson A, Theodorsson E (2009) Dose-related neuroprotective versus neurodamaging effects of estrogens in rat cerebral ischemia: a systematic analysis. J Cereb Blood Flow Metab 29:1359-1372.
- Sun J, Chu Z, Moenter SM (2010) Diurnal in vivo and rapid in vitro effects of estradiol on voltage-gated calcium channels in gonadotropin-releasing hormone neurons. J Neurosci 30:3912-3923.
- Szego CM, Davis JS (1967) Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. Proc Natl Acad Sci U S A 58:1711-1718.
- Tallini YN, Shui B, Greene KS, Deng KY, Doran R, Fisher PJ, Zipfel W, Kotlikoff MI (2006) BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral cholinergic neurons. Physiol Genomics 27:391-397.
- Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME (1998) Ca2+ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. Neuron 20:709-726.
- Temple JL, Laing E, Sunder A, Wray S (2004) Direct action of estradiol on gonadotropinreleasing hormone-1 neuronal activity via a transcription-dependent mechanism. J Neurosci 24:6326-6333.
- Terasawa E, Fernandez DL (2001) Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. Endocr Rev 22:111-151.
- Terasawa E, Noel SD, Keen KL (2009) Rapid action of oestrogen in luteinising hormonereleasing hormone neurones: the role of GPR30. J Neuroendocrinol 21:316-321S.
- Thoenen H, Bandtlow C, Heumann R (1987) The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. Rev Physiol Biochem Pharmacol 109:145-178.
- Toran-Allerand CD (2006) Reply to 'Hormone in the hot seat'. Nat Med 12:379-380.
- Toran-Allerand CD, Singh M, Setalo G, Jr. (1999) Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. Front Neuroendocrinol 20:97-121.
- Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES, Nethrapalli IS, Tinnikov AA (2002) ER-X: a novel, plasma membrane-associated,

putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. J Neurosci 22:8391-8401.

- Torres-Aleman I, Rejas MT, Pons S, Garcia-Segura LM (1992) Estradiol promotes cell shape changes and glial fibrillary acidic protein redistribution in hypothalamic astrocytes in vitro: a neuronal-mediated effect. Glia 6:180-187.
- Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. Mol Endocrinol 11:353-365.
- Tucek S (1985) Regulation of acetylcholine synthesis in the brain. J Neurochem 44:11-24.
- Van Hoesen GW, Mesulam MM, Haaxma R (1976) Temporal cortical projections to the olfactory tubercle in the rhesus monkey. Brain Res 109:375-381.
- Vasudevan N, Kow LM, Pfaff DW (2001) Early membrane estrogenic effects required for full expression of slower genomic actions in a nerve cell line. Proc Natl Acad Sci U S A 98:12267-12271.
- Vries GJ (1990) Sex differences in neurotransmitter systems. J Neuroendocrinol 2:1-13.
- Wade CB, Dorsa DM (2003) Estrogen activation of cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-mediated transcription requires the extracellularly regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway. Endocrinology 144:832-838.
- Wade CB, Robinson S, Shapiro RA, Dorsa DM (2001) Estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta exhibit unique pharmacologic properties when coupled to activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. Endocrinology 142:2336-2342.
- Walker LC, Kitt CA, DeLong MR, Price DL (1985) Noncollateral projections of basal forebrain neurons to frontal and parietal neocortex in primates. Brain Res Bull 15:307-314.
- Walton MR, Dragunow I (2000) Is CREB a key to neuronal survival? Trends Neurosci 23:48-53.
- Wenk GL, Willard LB (1998) The neural mechanisms underlying cholinergic cell death within the basal forebrain. Int J Dev Neurosci 16:729-735.
- Wenk GL, Cribbs B, McCall L (1984) Nucleus basalis magnocellularis: optimal coordinates for selective reduction of choline acetyltransferase in frontal neocortex by ibotenic acid injections. Exp Brain Res 56:335-340.
- Wessler S, Otto C, Wilck N, Stangl V, Fritzemeier K-H (2006) Identification of estrogen receptor ligands leading to activation of non-genomic signaling pathways while exhibiting only weak transcriptional activity. J Steroid Biochem Mol Biol 98:25-35.
- Whitehouse PJ, Hedreen JC, White CL, Price DL (1983) Basal forebrain neurons in the dementia of Parkinson disease. Ann Neurol 13:243-248.
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. Science 215:1237-1239.
- Wiegand SJ, Terasawa E (1982) Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. Neuroendocrinology 34:395-404.
- Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Grone H, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Perez CA, Schutz G, Herbison AE (2006) Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. Neuron 52:271-280.
- Witelson SF, Glezer II, Kigar DL (1995) Women have greater density of neurons in posterior temporal cortex. J Neurosci 15:3418-3428.
- Witkin JW, Paden CM, Silverman AJ (1982) The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. Neuroendocrinology 35:429-438.
- Woolley CS, McEwen BS (1993) Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. J Comp Neurol 336:293-306.
- Wray S, Hoffman G (1986) A developmental study of the quantitative distribution of LHRH neurons within the central nervous system of postnatal male and female rats. J Comp Neurol 252:522-531.
- Wray S, Grant P, Gainer H (1989) Evidence that cells expressing luteinizing hormonereleasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. Proc Natl Acad Sci 86:8132-8136.
- Yagi K (1973) Changes in firing rates of single preoptic and hypothalamic units following an intravenous administration of estrogen in the castrated female rat. Brain Res 53:343-352.
- Yan Q, Radeke MJ, Matheson CR, Talvenheimo J, Welcher AA, Feinstein SC (1997) Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. J Comp Neurol 378:135-157.
- Yeo TT, Chua-Couzens J, Butcher LL, Bredesen DE, Cooper JD, Valletta JS, Mobley WC, Longo FM (1997) Absence of p75NTR causes increased basal forebrain cholinergic neuron size, choline acetyltransferase activity, and target innervation. J Neurosci 17:7594-7605.
- Zaborszky L, Pang K, Somogyi J, Nadasdy Z, Kallo I (1999) The basal forebrain corticopetal system revisited. Ann N Y Acad Sci 877:339-367.
- Zaulyanov LL, Green PS, Simpkins JW (1999) Glutamate receptor requirement for neuronal death from anoxia-reoxygenation: an in Vitro model for assessment of the neuroprotective effects of estrogens. Cell Mol Neurobiol 19:705-718.
- Zheng H, Xu H, Uljon SN, Gross R, Hardy K, Gaynor J, Lafrancois J, Simpkins J, Refolo LM, Petanceska S, Wang R, Duff K (2002) Modulation of A(beta) peptides by estrogen in mouse models. J Neurochem 80:191-196.
- Zhou Y, Watters JJ, Dorsa DM (1996) Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain: Endocrinology. 137 (5) (pp 2163-2166), 1996. Date of Publication: 1996.

<u>8.2. Az értekezés alapjául szolgáló, a szövegben sorszámmal citált saját közlemények</u> jegyzéke

- Kőszegi Zs, Ábrahám IM Effect of ageing on post-lesion oestradiol treatment on mouse cholinergic neurones in vivo JOURNAL OF NEUROENDOCRINOLOGY 24:(9) pp. 1243-1248. (2012) IF: 3,138
- Cheong RY, Kwakowsky A, Barad Z, Porteous R, Herbison AE, Abraham IM Estradiol Acts Directly and Indirectly on Multiple Signaling Pathways to Phosphorylate cAMP-Response Element Binding Protein in GnRH Neurons. ENDOCRINOLOGY 153:(8) pp. 3792-3803. (2012) IF: 4,459
- Andrea Kwakowsky, Allan E Herbison, István M Ábrahám The Role of cAMP Response Element Binding Protein in Estrogen Negative Feedback Control of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons JOURNAL OF NEUROSCIENCE 32:(33):11309-17. (2012) IF:7,1
- 4. Szego EM, Csorba A, Janaky T, Kekesi KA, Abraham IM, Morotz GM, Penke B, Palkovits M, Murvai U, Kellermayer MS, Kardos J, Juhasz GD Effects of Estrogen on Beta-Amyloid-Induced Cholinergic Cell Death in the Nucleus Basalis Magnocellularis NEUROENDOCRINOLOGY 93: pp. 90-105. (2011) IF: 2.376, Független idézetek száma: 3
- Kőszegi Zs, Szegő ÉM, Cheong RY, Tolod-Kemp E, Ábrahám IM Post-lesion estradiol treatment increases cortical cholinergic innervations via estrogen receptor alpha dependent non-classical estrogen signaling in vivo ENDOCRINOLOGY 152:(9) pp. 3471-3482. (2011) IF:4,45.
- Adori M, Kiss E, Barad Zs, Barabás K, Kiszely E, Schneider A, Kövesdi D, Sziksz E, Abraham IM, Matkó J, Sármay G Estrogen augments the T cell-dependent but not the T-independent immune response CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 67:(14) pp. 1661-1674. (2010) IF: 7,047, Független idézetek száma:3
- Sarvari M, Szego EM, Barabas K, Javor A, Toth S, Kovacs Z, Abraham IM Genistein Induces Phosphorylation of cAMP Response Element-binding Protein in Neonatal Hypothalamus In Vivo JOURNAL OF NEUROENDOCRINOLOGY 21:(12) pp. 1024-1028. (2009) IF: 3,700, Független idézetek száma: 3
- 8. **Ábrahám IM**, Kőszegi Zs, Tolod-Kemp E, Szegő ÉM Action of estrogen on survival of basal forebrain cholinergic neurons: promoting amelioration.

PSYCHONEUROENDOCRINOLOGY 34: pp. S104-S112. (2009) IF: 4,194, Független idézetek száma: 6

- Romano N, Lee K, Abraham IM, Jasoni CL, Herbison AE Nonclassical Estrogen Modulation of Presynaptic GABA Terminals Modulates Calcium Dynamics in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons ENDOCRINOLOGY 149:(11) pp. 5335-5344. (2008) IF: 4,945, Független idézetek száma: 27
- 10. Szego EM, Barabas K, Balog J, Szilagyi N, Korach KS, Juhasz G, Abraham IM Estrogen induces estrogen receptor alpha-dependent cAMP response element-binding protein phosphorylation via mitogen activated protein kinase pathway in basal forebrain cholinergic neurons in vivo. JOURNAL OF NEUROSCIENCE 26:(15) pp. 4104-4110. (2006) IF: 7,453, Független idézetek száma: 53
- Barabas K, Szego EM, Kaszas A, Nagy GM, Juhasz GD, Abraham IM Sex differences in oestrogen-induced p44/42 MAPK phosphorylation in the mouse brain in vivo JOURNAL OF NEUROENDOCRINOLOGY 18:(8) pp. 621-628. (2006) IF: 2,774, Független idézetek száma: 5
- Abraham IM, Herbison AE Major sex differences in non-genomic estrogen actions on intracellular signaling in mouse brain in vivo NEUROSCIENCE 131:(4) pp. 945-951. (2005) IF: 3,410, Független idézetek száma: 33
- Abraham IM, Todman MG, Korach KS, Herbison AE Critical in vivo roles for classical estrogen receptors in rapid estrogen actions on intracellular signaling in mouse brain ENDOCRINOLOGY 145:(7) pp. 3055-3061. (2004) IF: 5,151, Független idézetek száma: 109
- 14. Abraham IM, Han SK, Todman MG, Korach KS, Herbison AE Estrogen receptor beta mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo

JOURNAL OF NEUROSCIENCE 23:(13) pp. 5771-5777. (2003) IF: 8,306, Független idézetek száma: 121

15. Ábrahám I, Harkany T, Horvath KM, Veenema AH, Penke B, Nyakas C, Luiten PGM

Chronic corticosterone administration dose-dependently modulates $A\beta(1-42)$ - and NMDA-induced neurodegeneration in rat magnocellular nucleus basalis. JOURNAL

OF NEUROENDOCRINOLOGY 12: pp. 486-494. (2000) IF: 2,598, Független idézetek száma: 45

- 16. Harkany T, Ábrahám I, Timmerman W, Laskay G, Tóth B, Sasvári M, Kónya C, Sebens JB, Korf J, Nyakas C, Zarándi M, Soós K, Penke B, Luiten PGM β-Amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nuclesus basalis EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE 12: pp. 2735-2745. (2000) IF: 3,862, Független idézetek száma:121
- 17. Kwakowsky A, Potapov, Koszegi Zs, Barad Zs, Bunn S, Kusumi A, Abraham IM Single molecule analysis of non-calssical estrogen action on neutrophin receptors. Készülőben.

Az értekezéshez felhasznált cikkek össz impakt faktora:74,963

Az értekezéshez felhasznált cikkekre kapott független hivatkozások száma: 529

8.3. A PhD fokozat megszerzése óta megjelent egyéb saját közlemények

Bhattarai JP, Kaszas A, Park SA, Yin H, Park SJ, Herbison AE, Han SK, **Abraham IM** Somatostatin Inhibition of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons in Female and Male Mice. ENDOCRINOLOGY 151:(7) pp. 3258-3266. (2010) IF: 4,993

Kwakowsky A, Schwirtlich M, Kooy F, **Ábrahám I**, Máté Z, Katarova Z, Szabó G GABA neurotransmitter signaling in the developing mouse lens: Dynamic regulation of components and functionality. DEVELOPMENTAL DYNAMICS 237:(12) pp. 3830-3841. (2008) IF: 3,018

Papp AM, Nyilas R, Szepesi Z, Lorincz ML, Takacs E, **Abraham I**, Szilagyi N, Toth J, Medveczky P, Szilagyi L, Juhasz G, Juhasz G Visible light induces matrix metalloproteinase-9 expression in rat eye JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY 103:(6) pp. 2224-2233. (2007) IF: 4,451

Kovács Z, Kékesi KA, Szilágyi N, **Ábrahám I**, Székács D, Király N, Papp E, Császár I, Szego E, Barabás K, Péterfy H, Erdei A, Bártfai T, Juhász G Facilitation of spike-wave discharge activity by lipopolysaccharides in Wistar Albino Glaxo/Rijswijk rats. NEUROSCIENCE 140:(2) pp. 731-742. (2006) IF: 3,427

Abraham IM, Meerlo P, Luiten PG Concentration dependent actions of glucocorticoids on neuronal viability and survival. DOSE-RESPONSE 4:(1) pp. 38-54. (2006)

Han SK, **Abraham IM**, Herbison AE Effect of GABA on GnRH neurons switches from depolarization to hyperpolarization at puberty in the female mouse. ENDOCRINOLOGY 143:(4) pp. 1459-1466. (2002) IF: 5,095

Ábrahám IM, Harkany T, Horvath KM, Luiten PGM Action of glucocorticoids on survival of nerve cells: promoting neurodegeneration or neuroprotection? JOURNAL OF NEUROENDOCRINOLOGY 13:(9) pp. 749-760. (2001) IF: 2,580

Horvath KM, **Ábrahám IM**, Harkany T, Meerlo P, Bohus BGJ, Nyakas Cs, Luiten PGM Postnatal treatment with ACTH-(4-9) analog ORG 2766 attenuates N-methyl-D-aspartateinduced excitotoxicity in rat nucleus basalis in adulthood. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY 405: pp. 33-42. (2000) IF: 2,236

Harkany T, **Ábrahám I**, Kónya C, Nyakas C, Zarándi M, Penke B, Luiten PGM Mechanisms of B-amyloid neurotoxicity: perspectives of pharmacotherapy. REVIEWS IN THE NEUROSCIENCES 11: pp. 329-382. (2000) IF: 3,400

Harkany T, Dijkstra IM, Oosterink BJ, Horvath KM, **Ábrahám I**, Keijser J, Van der Zee EA, Luiten PGM Increased amyloid precursor protein expression and serotonergic sprouting following excitotoxic lesion of the rat magnocellular nucleus basalis: neuroprotection by Ca²⁺ antagonist nimodipine. NEUROSCIENCE 101: pp. 101-114. (2000) IF: 3,563

Ábrahám IM, Kovács KJ Postnatal handling alters the activation of stress-related neuronal circuitries. EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE 12: pp. 3003-3014. (2000) IF: 3,862

Harkany T, **Ábrahám I**, Laskay G, Timmerman W, Jost K, Zarándi M, Penke B, Nyakas Cs, Luiten PGM Propionyl-IIGL tetrapeptide antagonizes β-amyloid excitotoxicity in rat nucleus basalis. NEUROREPORT 10: pp. 1693-1698. (1999) IF: 2,682

113

Harkany T, Mulder J, Sasvári M, **Ábrahám I**, Kónya C, Zarándi M, Penke B, Luiten PGM, Nyakas C N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 and radical scavengers protect cholinergic nucleus basalis neurons against β -amyloid neurotoxicity. NEUROBIOLOGY OF DISEASE 6: pp. 109-121. (1999) IF: 5,023

<u>8.4. Szcientometriai adatok az értekezés benyújtásakor</u>
Saját cikkek száma nemzetközi folyóiratban: 35
Idézetek száma: 1225
Független idézetek száma: 1010
Összegzett impakt faktor:130,469